

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

FACULTADE DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA



**SÍNTESIS DE PROLINA-MIMÉTICOS 3,5-DISUSTITUIDOS Y SU
APLICACIÓN EN LA CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS CON
POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Joana Raquel Ferreira da Costa

Santiago de Compostela, Mayo de 2013



**SÍNTESIS DE PROLINA-MIMÉTICOS 3,5-
DISUSTITUIDOS Y SU APLICACIÓN EN LA
CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS CON POTENCIAL
ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Memoria para optar al grado de Doctor

Joana Raquel Ferreira da Costa



Dña. OLGA CAAMAÑO SANTOS, Profesora Titular de Química Orgánica, D. FRANCO FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, Catedrático de Química Orgánica y D. XERARDO GARCÍA MERA, Profesor Titular de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada *SÍNTESIS DE PROLINA-MIMÉTICOS 3,5-DISUSTITUIDOS Y SU APLICACIÓN EN LA CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA*, que para optar al Grado de Doctor presenta JOANA RAQUEL FERREIRA DA COSTA, ha sido realizada bajo nuestra dirección conjunta en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y considerando que el trabajo realizado constituye tema y labor de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, expedimos la presente certificación en Santiago de Compostela, mayo de dos mil trece.

Fdo.: Olga Caamaño Santos

Fdo.: Franco Fernández González

Fdo.: Xerardo García Mera





AGRADECIMIENTOS



A D. Franco Fernández por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por guiarme a lo largo de estos años.

Mis más profundos agradecimientos a Dña. Olga Caamaño por sus consejos, apoyo, paciencia, amabilidad en todos los momentos, sobretodo los más difíciles. Ha sido mi tutora, amiga y no pocas veces: madre. Nunca olvidaré todo lo que ha hecho por mí.

A D. Xerardo García por todo el apoyo y consejos a la realización de esta tesis.

A los profesores Mari Carmen y José Enrique Borges por ayudar con su experiencia a que este trabajo llegara a buen puerto y a los profesores del departamento, José Manuel, Lourdes, Eugenio, Eddy y Ana por todo el interés y disponibilidad siempre que he necesitado.

Al profesor Christian Masaguer de forma especial por facilitarme el uso del microondas que permitió la realización de una parte de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por todo lo vivido dentro y fuera de él. A Isa por su paciencia, y por todo lo que me ha enseñado en los primeros años. A Alexandra, Federica y Annalisa por las pequeñas pero tan importantes aportaciones realizadas a este trabajo. A Paula y a Pili porque de alguna manera habéis participado y me habéis ayudado a desarrollar este trabajo. A Nerea por ser no solo mi compañera sino mi amiga, gracias por todos los consejos y apoyo en los últimos años que trabajamos juntas, hasta mismo desde Toledo y por todos los buenos momentos vividos.

A todos los miembros de los grupos de investigación de la Facultad de Farmacia, especialmente a Karen por haber sido más que una compañera, una amiga de verdad.

Thanks to Professor Michele Vendruscolo and all of the members of his group, especially to Rinaldo and Alex for all the patience and for all that they taught me. And to Alfonso who made possible to me to go to the University of Cambridge.

Obrigada ao Professor Sílvio e a todos os membros do grupo GPSQ, da Universidade Federal da Bahia, por me receberem tão bem e pelos bons momentos vividos juntos.

A Xosé y Daniel por el apoyo técnico y por resolver todas mis dudas y problemas de manera impecable.

A Mencha y a los demás integrantes de los servicios de RMN, Rayos X y Masas, por los análisis aquí descritos y por su eficaz trabajo.

A Lionel por sus consejos y pequeños préstamos para la síntesis de péptidos.

A José Manuel Brea y al equipo de Maria Isabel Cadavid de la Unidad de Avaliación de Actividades Farmacológicas de Compuestos Químicos de la Universidade de Santiago de Compostela por los ensayos farmacológicos realizados.

Al personal del Colegio Mayor Fonseca y de la cafetería por hacer que Fonseca fuera mi segunda casa. A Chus por toda la preocupación y cariño conmigo. A los amigos q ahí hice y que llevo conmigo, a Dani por compartir conmigo los momentos de alegría pero también los de desespero. A Roci y a David por estaren siempre que he necesitado.

Obrigada aos amigos do Porto, à Marta e a Sara porque mesmo com a distância sempre tiveram uma palavra de apoio e porque sempre me receberam com os braços abertos.

À minha mãe e ao meu pai porque lhes devo tudo o que sou hoje e por me deixarem voar ao encontro dos meus sonhos. À minha irmã por estar sempre atenta e pelo apoio incondicional.

E a Jeff, meu amor, por estar sempre ao meu lado. Por acreditar e nunca desistir de mim, animando-me sempre a continuar e por toda a ajuda na escrita e resolução dos problemas na conclusão desta tese.

A todos mi eterno agradecimiento.

Parte del trabajo recogido en esta memoria ha sido publicado o esta en proceso de publicación:

Joana Ferreira da Costa, Olga Caamaño, Franco Fernández, Xerardo García-Mera, Pilar Midón, José Enrique Rodríguez-Borges. "Synthesis of methyl (\pm)-3,5-bis(substitutedmethyl) pyrrolidine-2-carboxylates: a convenient approach to proline-mimetics". *Tetrahedron* **2010**, 66, 6797.

Joana Ferreira da Costa, Olga Caamaño, Franco Fernández, Xerardo García-Mera, Ivo E. Sampaio-Dias, José Manuel Brea, María Isabel Cadavid. "Synthesis and Allosteric Modulation of the Dopamine Receptor by Peptide Analogs of l-Prolyl-l-Leucyl-l-Glycinamide (PLG) Modified in the L-Proline or L-Proline and L-Leucine scaffolds". *Journal of Medicinal Chemistry*, sometido.

Joana Ferreira da Costa, Olga Caamaño, Franco Fernández, Xerardo García-Mera. "Synthesis of 3,5-Dimethyl-substituted Proline Derivatives; Application to the Synthesis of Proline-Modified Analogues of the Neuroprotective Agent Glycine-L-Proline-L-Glutamic acid (GPE)", manuscrito en preparación.





I. ÍNDICE



I. ÍNDICE.....	I
II. RELACIÓN DE ABREVIATURAS	XIII
III. RELACIÓN DE COMPUESTOS DESCRITOS	XIX
IV. SUMMARY.....	XXIX
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. PROLINA-MIMÉTICOS.....	3
1.1.1. Antecedentes	3
1.1.2. Aplicaciones de los compuestos prolina-miméticos en síntesis de fármacos	5
1.2. ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE LOS TRIPÉPTIDOS L-PROLIL-L-LEUCIL-GLICINAMIDA (PLG) Y GLICIL-L-PROLIL-ÁCIDO L-GLUTAMICO (GPE).....	8
1.2.1. Antecedentes	8
1.2.2. Enfermedades neurodegenerativas.....	8
1.2.2.1. Aspectos generales.....	8
1.2.2.2. Enfermedad de Parkinson: etiología y tratamiento	9
1.2.2.3. Enfermedad de Alzheimer: etiología y tratamiento.....	13
1.3. DOPAMINA, CIRCUITOS Y RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS	17
1.3.1. Antecedentes	17
1.3.2. Circuitos dopaminérgicos	17
1.3.3. Receptores de dopamina	19
1.3.3.1. Familias y estructura básica de receptores de dopamina.....	19
1.3.3.2. Receptores de la familia D ₂	21
1.4. PEQUEÑOS PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA	23
1.4.1. Aspectos generales.....	23
1.4.2. Estructura secundaria de los péptidos.....	24
1.4.3. PLG como modulador alostérico de receptores dopaminérgicos D ₂ y su posible interés en el tratamiento de enfermedades que afectan al SNC	26
1.4.3.1. Interacción PLG-proteínas receptoras	26
1.4.3.2. PLG como ligando alostérico.....	27

1.4.3.3. Análogos sintéticos de PLG.....	30
1.4.4. GPE, tripéptido N-terminal del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y su posible utilidad en el tratamiento de procesos neurodegenerativos.....	33
1.4.4.1. Antecedentes.....	33
1.4.4.2. Utilidad terapéutica.....	34
1.4.4.3. Análogos de GPE de interés como neuroprotectores.....	35
1.5. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	38
1.5.1. Aspectos generales.....	38
1.5.2. Análogos de nucleósidos portadores de bases atípicas en el tratamiento de la hepatitis C y como inmunosupresores.....	42
1.6. OBJETIVOS.....	46
1.6.1. Síntesis de prolina-miméticos 3,5-disustituídos	46
1.6.2. Síntesis de tripéptidos análogos de los neuropéptidos GPE y PLG	47
1.6.3. Síntesis de 1'-homoozanol nucleósidos	49
1.6.3.1. 1'-Homoozanol nucleósidos portadores de bases atípicas.....	49
1.6.3.2. 1'-Homoozanol nucleósidos portadores de bases púricas.....	50
2. QUÍMICA: PARTE TEÓRICA Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51
2.1. DESARROLLO DE COMPUESTOS PROLINA-MIMÉTICOS.....	53
2.1.1. Planteamiento sintético	53
2.1.1.1. Síntesis de los amino hidroxí ésteres precursores 15 y 22	53
2.1.1.2. Síntesis de derivados prolina-miméticos 3,5-disustituídos.....	55
2.1.2. Desarrollo de los procesos sintéticos conducentes a los derivados prolina-miméticos 3,5 disustituídos	56
2.1.2.1. Reacción de Diels-Alder.....	56
2.1.2.2. Reacción de aza-Diels-Alder. Síntesis de la mezcla de aductos exo/endo-20..	58
2.1.2.3. Síntesis del 3,5-bis(hidroximetil)éster 15.....	62
2.1.2.3.1. Síntesis del dihidroxíéster bicíclico 21.....	62
2.1.2.4. Hidrogenación catalítica: hidrógenolisis de enlaces C-N y reducción de azidas	65
2.1.2.4.1. Catalizadores de hidrogenación	66

2.1.2.4.2. Proceso de hidrogenación catalítica.....	67
2.1.2.4.3. Proceso de hidrógenolisis catalítica	68
2.1.2.4.4. N-Desbencilación del compuesto 15 . Síntesis de los ésteres metílicos 22 y 29	68
2.1.2.4.5. Reducción de azidas. Síntesis de los aminometilésteres 30 y 32	71
2.1.2.5. Sustitución nucleófila sobre derivados activados de grupos hidroxilo.....	72
2.1.2.5.1. Síntesis de los alquilsulfonatos 33–35 , 38 y 39b	72
2.1.2.5.2. Síntesis de compuestos prolina-miméticos portadores de grupos azido y ciano, 16 , 31 , 36 , 37b y 40	75
2.1.2.5.3 Éteres a partir de alcoholes: Reacción de Williamson. Síntesis de compuestos prolina-miméticos portadores de grupos éter, 41–43	76
2.1.2.6. Preparación de estructuras triazólicas	77
2.1.2.6.1. Síntesis de triazoles	77
2.1.2.6.2. Química clic	78
2.1.2.6.3. Reacción de adición 1,3-dipolar de Huisgen	81
2.1.2.6.4. Reacción de adición 1,3-dipolar de Huisgen asistida por microondas	82
2.1.2.6.5. Resultados propios. Síntesis de 3,5-bis[(4-aryl-1,2,3-triazol-4-il)metil] pirrolidina-2-carboxilatos de metilo 45 y 46	87
2.1.2.6.6. Resultados propios. Síntesis de 1'-homoisoazanucleósidos 47–54	88
2.1.2.7. Construcción de derivados púricos. 1'-Homoisoazanucleósidos portadores de bases púricas.....	91
2.1.2.7.1. Resultados propios	92
2.2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	93
2.2.1. Principios de la síntesis de péptidos.....	93
2.2.2. Grupos Protectores	95
2.2.2.1. Protección del grupo amino	95
2.2.2.2. Protección del grupo carboxilo.....	98
2.2.3. Formación del enlace peptídico.....	99
2.2.3.1. Generalidades	99

2.2.3.2. Principales agentes acilantes y reactivos de acoplamiento empleados en síntesis de péptidos.....	100
2.2.4. Resultados propios	107
2.2.4.1. Preparación de diamidas derivadas de 3,5-bis(aminometil)prolinas.....	107
2.2.4.2. Preparación de dipéptidos.....	108
2.2.4.3. Preparación del tripéptido 68 análogo al GPE.....	112
2.2.4.4. Preparación de los tripéptidos 73–75 y 81–83 análogos de PLG.....	113
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	121
3.1. ASPECTOS GENERALES	123
3.2. 2-Hidroxi-2-metoxiacetato de metilo	125
3.3. (±)- <i>exo</i> -(2-Bencil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno)-3-carboxilato de metilo (<i>exo</i> -20) y (±)- <i>endo</i> -(2-bencil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno)-3-carboxilato de metilo (<i>endo</i> -20) ...	125
3.4. (±)- <i>exo</i> -(2-Bencil-5,6-dihidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptano)-3-carboxilato de metilo (21)	126
3.5. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-Bencil-3,5-bis(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (15)	127
3.6. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-Bencil-3,5-bis[(<i>p</i> -tolilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (33) y (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-bencil-5-(hidroximetil)-3[(<i>p</i> -tolilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (34b)	128
3.7. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-Bencil-3,5-bis[(metilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (35)	134
3.8. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-Bis(azidometil)-1-bencilpirrolidina-2-carboxilato de metilo (36) y (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3-(azidometil)-1-bencil-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (37b)	137
3.8.1. Método A.....	137
3.8.2. Método B	140
3.9. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-Bencil-3,5-bis[(4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (45)	143
3.10. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-Bencil-3,5-bis[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (24)	146

3.11. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis[[(<i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (25)	149
3.12. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (22).....	152
3.12.1. Método A.....	152
3.12.2. Método B	155
3.13. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-Bis[[(<i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (29)	156
3.14. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis(metiloximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (41) y (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-(metiloximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (42b).....	159
3.15. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-5-[[[(3,5-dinitrobenzoi)oxi]metil]-3-(metoximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (44).....	165
3.16. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3-(etiloximetil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (43b).....	168
3.17. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis[[(metilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (38).....	171
3.18. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis[[(metilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (38) y (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[[[(metilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (39b) ..	174
3.19. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis(cianometil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (40)	177
3.20. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (16)	181
3.21. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3-(Azidometil)-1-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (31)	184
3.22. Procedimiento general para la síntesis de los triazolil derivados 46a–46c y 47–53.....	187
3.22.1. Método A: reacción de Huisgen catalizada por cobre(I)	187
3.22.2. Método B: reacción de Huisgen asistida por microondas.....	187

3.22.3. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis-[(4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (46a).....	188
3.22.4. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis-[[4-(4-hidroximetil)fenil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (46b).....	191
3.22.5. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis-[[4-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (46c).....	194
3.22.6. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-3-[(4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil]-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (47).....	197
3.22.7. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-{[4-(4-metilfenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]}pirrolidina-2-carboxilato de metilo (48).....	201
3.22.8. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[[4-(4-hidroximetil)fenil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (49)....	204
3.22.9. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[[4-(2-metoxifenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (50).....	207
3.22.10. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3-[[4-(3-Aminofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (51).....	210
3.22.11. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[[4-(2-nitrofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (52).....	213
3.22.12. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[(4-metoxicarbonil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (53).....	216
3.23. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3-[(4-Aminocarbonil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]metil]-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (54).....	219
3.24. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-Bis(aminometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (30).....	222
3.25. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-Bis(acetamidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (57).....	225
3.25.1. Método A.....	225
3.25.2. Método B.....	228
3.26. (±)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)- <i>N</i> -(<i>terc</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis[[[(<i>D</i> - <i>N</i> - <i>terc</i> -butoxicarbonil)fenilalanil]amino]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (mezcla de 58a y 58b).....	229

3.27. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3,5-bis[[(2 <i>S</i>)-2-[[[(9 <i>H</i>)-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]-4-metilpentanoil]amino]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (mezcla de 59a y 59b)	233
3.28. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3-Aminometil-1-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (32).....	236
3.29. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3-[[[(5-Amino-6-cloropirimidin-4-il)amino]metil]-1-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (55)	239
3.30. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3-[(6-cloro-9 <i>H</i> -purin-9-il)metil]-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (19)	242
3.31. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)-3-[(6-ciclopropilamino-9 <i>H</i> -purina-9-il)metil]-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (56).....	245
3.32. Formación de los trifluoroacetatos 17, 23 y 61	248
3.32.1. Método general	248
3.32.2. Trifluoroacetato de (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-bis-[(4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (17·CF ₃ CO ₂ H)	248
3.32.3. Trifluoroacetato de (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-bis(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (23·CF ₃ CO ₂ H)	251
3.32.4. Trifluoroacetato de (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-bis(azidometil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (61·CF ₃ CO ₂ H)	254
3.33. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-Bis(azidometil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (61) ...	257
3.34. Ácido (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-bis(azidometil)-1-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxílico (63)	260
3.35. Ácido (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-bis(azidometil)pirrolidina-2-carboxílico (65).....	263
3.36. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-Bis(azidometil)-1-[2-[(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino]acetil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (60)	266
3.36.1. Método A.....	266
3.36.2. Método B	269
3.37. (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-1-[2-(<i>tert</i> -Butoxicarbonil)amino]acetil]-3,5-bis[(4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (62) y (\pm)-(2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-3,5-bis-[(4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (17)	270

3.38. (2S)-2-[[[(2R*,3S*,5R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)pirrolidina-2-carbonil]amino]pentanodiato de dimetilo (mezcla de los diastereoisómeros 64a y 64b).	276
3.39. Trifluoroacetato de (2S)-2-[[[(2R*,3S*,5R*)-3,5-bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)pirrolidina-2-carbonil]amino]pentanodiato de dimetilo (mezcla de los diastereoisómeros 67a·CF ₃ CO ₂ H y 67b·CF ₃ CO ₂ H).	279
3.40. (2S)-2-[[[(2R*,3S*,5R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-[2-[(<i>terc</i> -butoxicarbonil)amino]acetil]pirrolidina-2-carbonil]amino]pentanodiato de dimetilo (mezcla de diastereoisómeros 68a y 68b)	282
3.41. D-[(3S,5R)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucinato de metilo (66a) y L-[(3R,5S)-3,5-bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucinato de metilo (66b)	285
3.42. D-[(3R,5S)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucina (69a).....	292
3.43. D-[(3S,5R)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicinato de metilo (70a)	295
3.44. D-[(3S,5R)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicina (71a)	298
3.45. D-[(3S,5R)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicinamida (72a)	301
3.46. Clorhidrato de D-[(3S,5R)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicinato de metilo (73a)	304
3.47. Clorhidrato de D-[(3S,5R)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicina(74a).....	307
3.48. Clorhidrato de D-[(3S,5R)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicinamida (75a)...	310
3.49. L-[(3R,5S)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucina (69b).....	313
3.50. L-[(3R,5S)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicinato de metilo (70b)	316
3.51. L-[(3R,5S)-3,5-Bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicinato de etilo (70b').....	319
3.52. L-[(3R,5S)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicinamida (72b).....	322
3.53. Clorhidrato de L-[(3R,5S)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicinato de metilo (73b).....	325

3.54. Clorhidrato de L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicinamida (75b)...	328
3.55. D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valinato de metilo (76a) y L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valinato de metilo (76b).....	331
3.56. D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valina (77a).....	338
3.57. D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicinato de metilo (78a)	341
3.58. D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicina (79a)	344
3.59. D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicinamida (80a)	347
3.60. Clorhidrato de D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicinato de metilo (81a)	350
3.61. Trifluoroacetato de D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicinato de metilo (84a)	353
3.62. Clorhidrato de D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicina (82a)	356
3.63. Clorhidrato de D-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicinamida (83a).....	359
3.64. L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valina (77b)	362
3.65. L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicinato de metilo (78b)	365
3.66. L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicina (79b)	368
3.67. L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-Bis(azidometil)-1-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicinamida (80b).....	371
3.68. Clorhidrato de L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicinatode metilo (81b)	374
3.69. Clorhidrato de L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicina (82b)	377
3.70. Clorhidrato de L-[(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicinamida (83b).....	380
4. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS.....	383

4.1. ENSAYOS DE COMPETICIÓN AGONISTA/ANTAGONISTA DEL RECEPTOR D₂ DE DOPAMINA.....	385
4.1.1. Material y métodos.....	385
<i>4.1.1.1. Preparación de membranas</i>	<i>385</i>
<i>4.1.1.2. Ensayos de unión al receptor D₂ humano</i>	<i>385</i>
<i>4.1.1.3. Resultados.....</i>	<i>386</i>
5. CONCLUSIONS.....	389
6. ANEXOS.....	393





II. RELACIÓN DE ABREVIATURAS



Å	angstrom
aa	aminoácido
Aβ	péptido β-amiloide
Aβ42	péptido amiloide insoluble Aβ 1-42
Ac	acetilo
AChE	<i>acetilcolinesterasa</i>
AcOEt	acetato de etilo
Ac ₂ O	anhídrido acético
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMP	adenosin monofosfato
Ar	arilo
ARN	ácido ribonucleico
atm	atmósfera
Bn	bencilo
BnNH ₂	bencilamina
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc-Gly-OH	<i>N-tert</i> -butoxicarbonilglicina
Boc-D-Phe-OH	<i>N-tert</i> -butoxicarbonil-D-fenilalanina
Boc ₂ O	dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
BOP-Cl	ácido bis(2-oxo-3-oxazolidino)fosfinico, cloruro de
Bz	benzoilo
°C	grado Celsius
CC	cromatografía en columna
CCF	cromatografía en capa fina
cm	centímetros
Col.	colaboradores
¹³ C RMN	resonancia magnética nuclear de carbono 13
δ	desplazamiento químico
DA	dopamina
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DDC	<i>dopadescarboxilasa</i>
DIEA	diisopropiletilamina
4-DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida

DMSO	dimetilsulfóxido
EA	enfermedad de Alzheimer
ed.	edición
Ed.	editor
Eds.	editores
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EH	enfermedad de Huntington
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
EM	espectrometría de masas
EM-AR	espectrometría de masas de alta resolución
EM-BAR	espectrometría de masas-bombardeo con átomos rápidos
EM-IE	espectrometría de masas-impacto electrónico
EM-IE-TDV	espectrometría de masas-ionización por electronebulización-tiempo de vuelo
EM-IQ	espectrometría de masas-ionización química
END	enfermedades neurodegenerativas
EP	enfermedad de Parkinson
equiv.	equivalentes
Et	etilo
Et ₃ N	triethylamina
EtOH	etanol
Et ₂ O	diethyléter
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
Fmoc-L-Leu-OH	<i>N</i> -(9-fluorenilmetoxycarbonil)-L-leucina
Fmoc-Osu	<i>N</i> -(9-fluorenilmetoxycarbonilo) succinimida
GDP	guanidino difosfato
Gly	glicina
Glu	glutamato
GPCRs	receptores de membrana asociados a proteínas G
GTP	guanidino trifosfato
h	horas
HATU	2-(1 <i>H</i> -7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, hexafluorofosfato de
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, hexafluorofosfato de

HC(OEt) ₃	ortoformiato de trietilo
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
¹ H RMN	resonancia magnética nuclear de protón
Hz	hercio
IR	infrarrojo
<i>i</i> -BuOCOC1	Isobutilo, cloroformiato de
L-dopa	levodopa
Leu	leucina
M	concentración molar
MAO	<i>monoamino oxidasa</i>
MAOS	síntesis orgánica asistida por microondas
Me	metilo
MeOH	metanol
mg	miligramos
MHz	megahercios
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mmol	milimoles
Ms	metilsulfonilo
MsCl	Metilsulfonilo, cloruro de
MW	microondas
<i>m/z</i>	relación masa/carga
NaAsc	sodio ascorbato
NADPHd	nicotinamida adenina dinucleótido hidrógeno fosfato diaforasa
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
nm	nanómetros
NOE	efecto nuclear Overhauser
NOMF	<i>N</i> -óxido de 4-metilmorfolina
NPA	<i>N</i> -propil- <i>nor</i> -apomorfina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
p.	pagina
p.f.	punto de fusión
Ph	fenilo
Ph ₃ P	trifenilfosfina

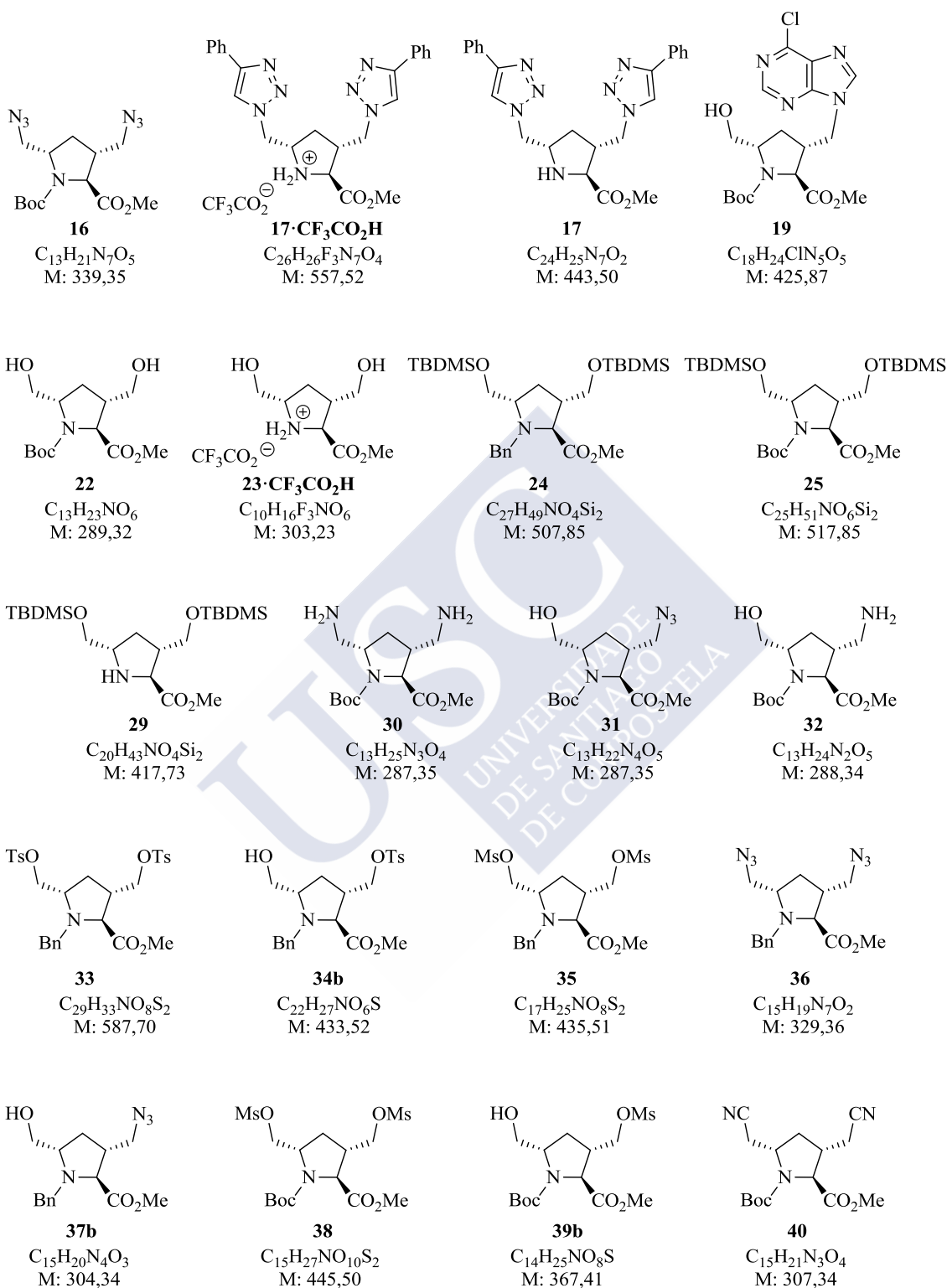
Relación de Abreviaturas

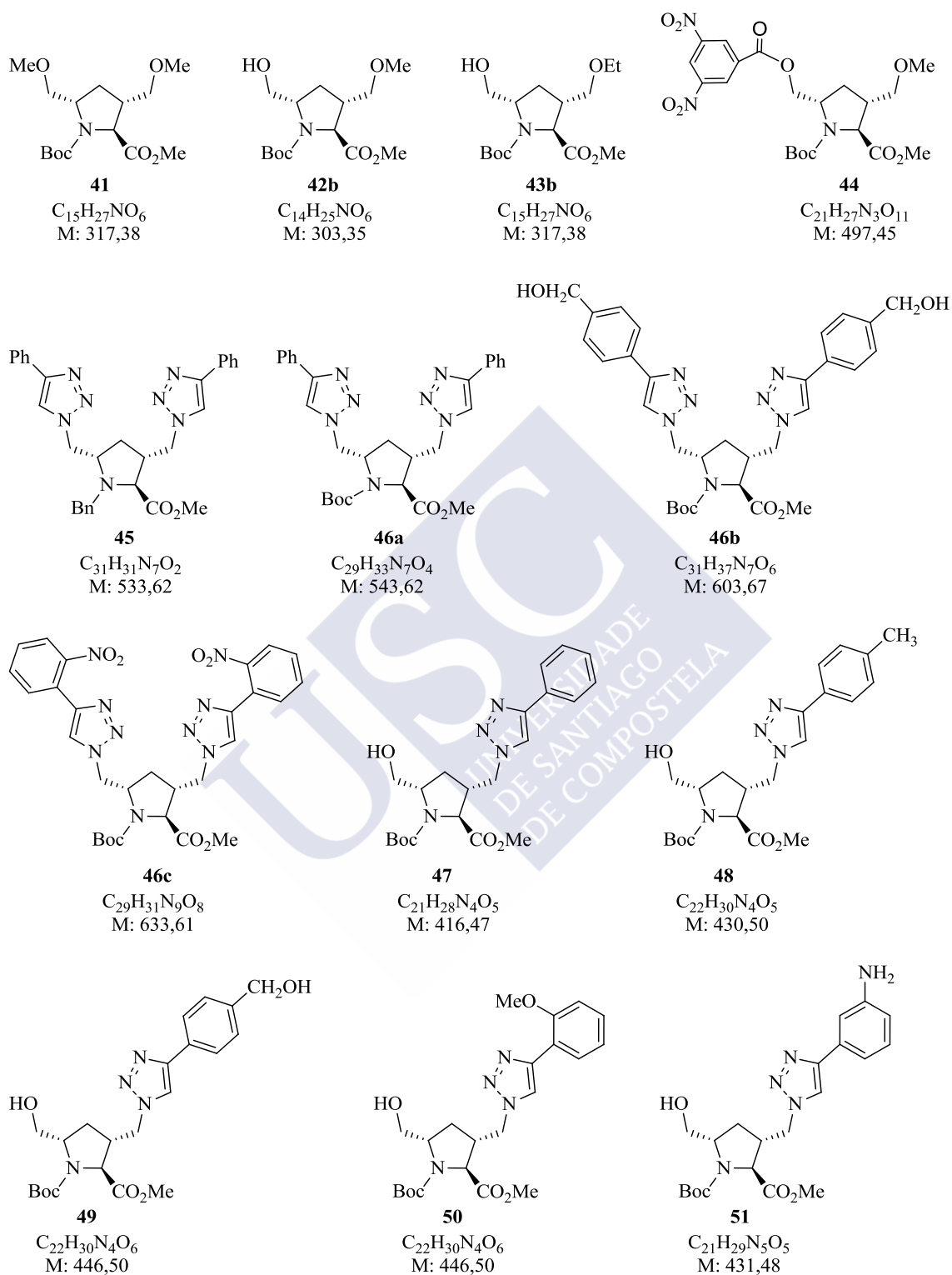
Phe	fenilalanina
PPA β	proteína precursora de A β
ppm	partes por millón
Pro	prolina
Rdto.	rendimiento
RMN	resonancia magnética nuclear
Ser	serina
SNC	sistema nervioso central
Su	succinimida
<i>t</i>	tiempo
t	temperatura
t.a.	temperatura ambiente
TBAF	tetrabutyl amonio, fluoruro de
TBDMSCl	<i>tert</i> -butildimetilsililo, cloruro de
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, tetrafluoroborato de
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TMS	tetrametilsilano
Tris-HCl	tris(hidroximetil)aminometano, clorhidrato de
Ts	4-toluenosulfonilo
TsCl	4-toluenosulfonilo, cloruro de
μ g	microgramos
μ L	microlitros
μ M	micromolar
ν	frecuencia
Val	valina
VHC	virus de la hepatitis C
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
vol.	volumen
W	vatio
Z	benciloxycarbonilo

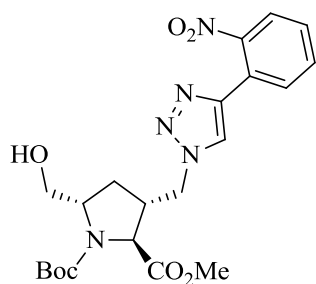


III. RELACIÓN DE COMPUESTOS DESCRITOS



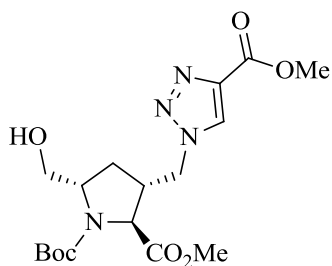






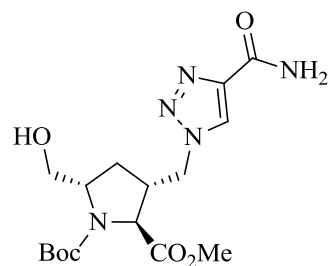
52

$C_{21}H_{27}N_5O_7$
M: 461,47



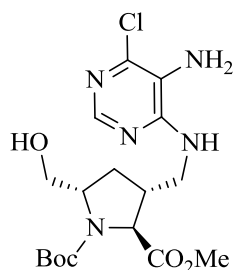
53

$C_{17}H_{26}N_4O_7$
M: 398,41



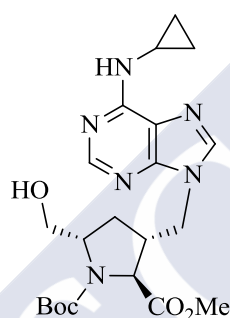
54

$C_{16}H_{25}N_5O_6$
M: 383,40



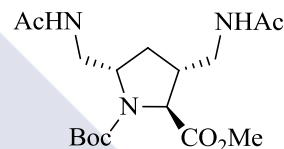
55

$C_{17}H_{26}ClN_5O_5$
M: 415,87



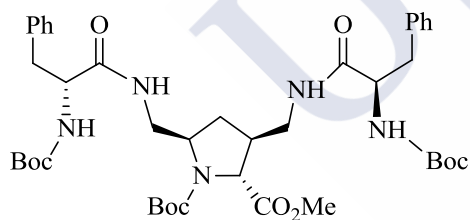
56

$C_{21}H_{30}N_6O_5$
M: 446,50



57

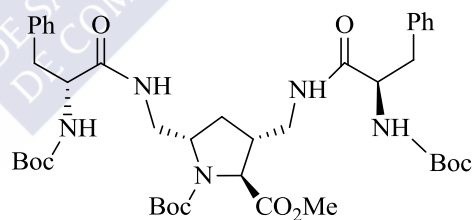
$C_{17}H_{29}N_3O_6$
M: 371,43



58a

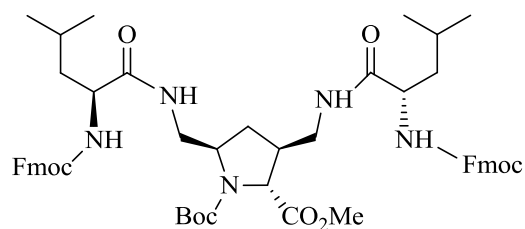
$C_{41}H_{59}N_5O_{10}$
M: 781,93

+



58b

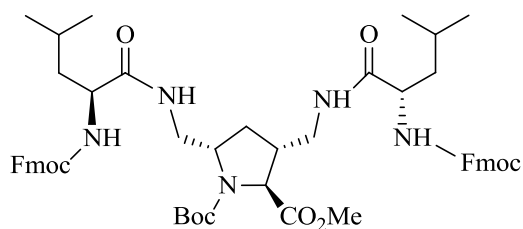
$C_{41}H_{59}N_5O_{10}$
M: 781,93



59a

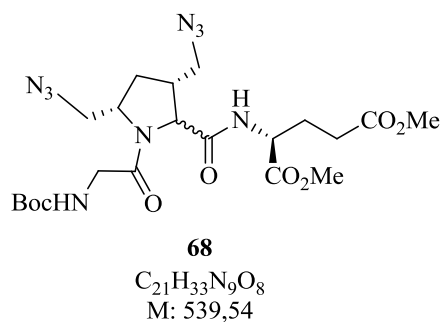
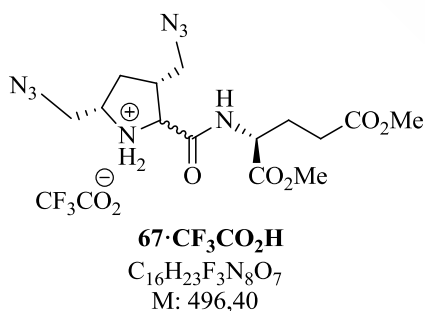
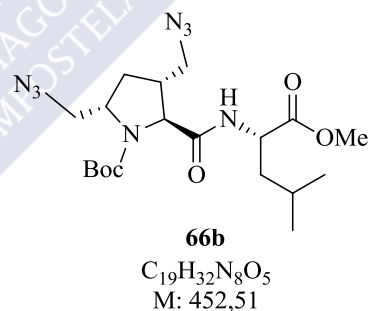
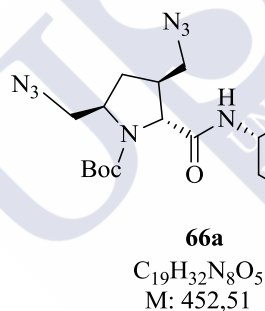
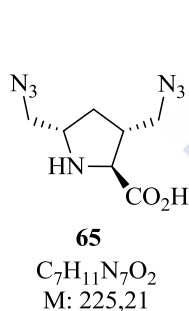
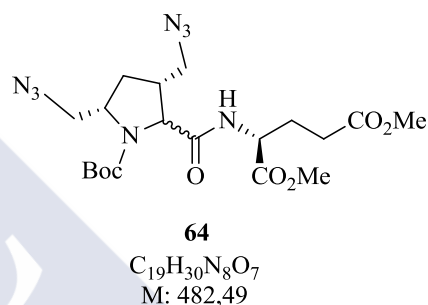
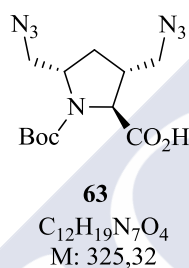
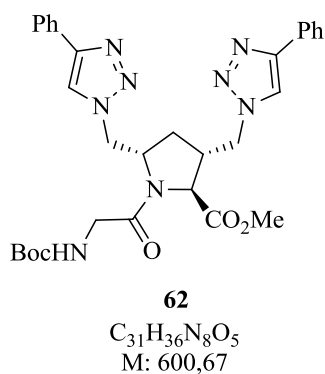
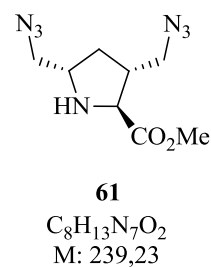
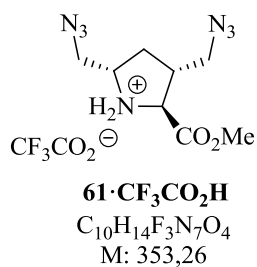
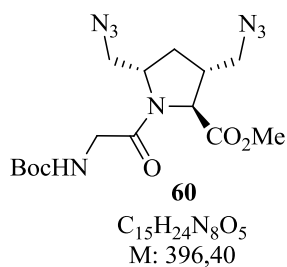
$C_{55}H_{67}N_5O_{10}$
M: 958,15

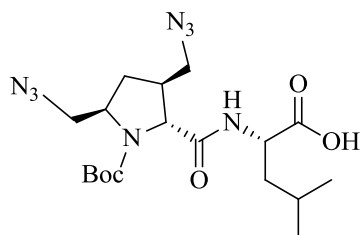
+



59b

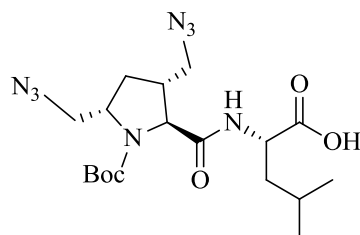
$C_{55}H_{67}N_5O_{10}$
M: 958,15





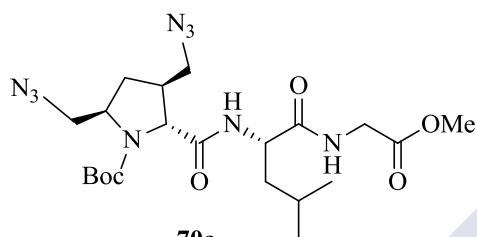
69a

$C_{18}H_{30}N_8O_5$
M: 438,48



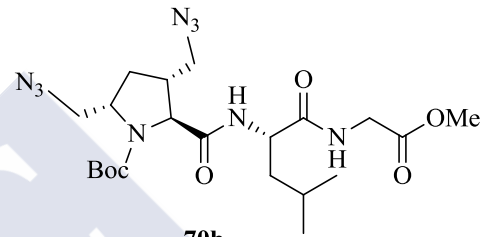
69b

$C_{18}H_{30}N_8O_5$
M: 438,48



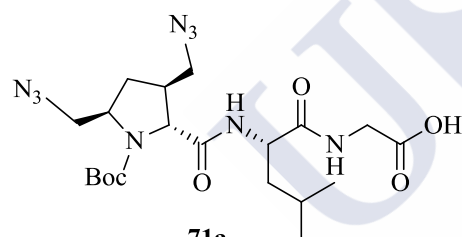
70a

$C_{21}H_{35}N_9O_6$
M: 509,56



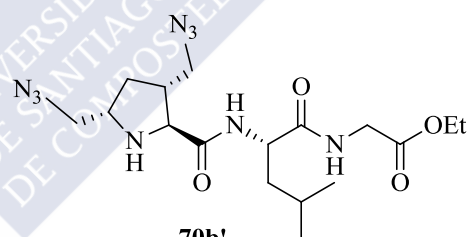
70b

$C_{21}H_{35}N_9O_6$
M: 509,56



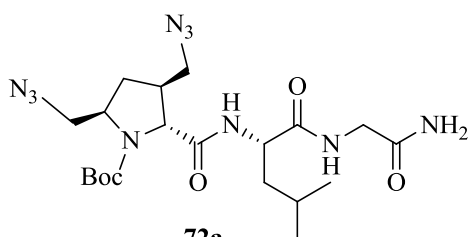
71a

$C_{20}H_{33}N_9O_6$
M: 495,53



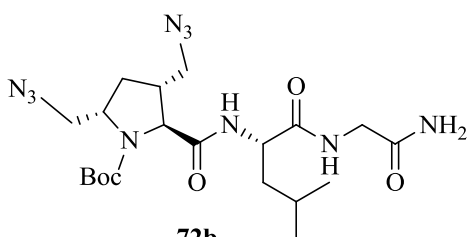
70b'

$C_{17}H_{29}N_9O_4$
M: 423,47



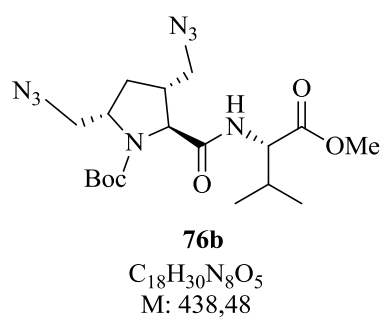
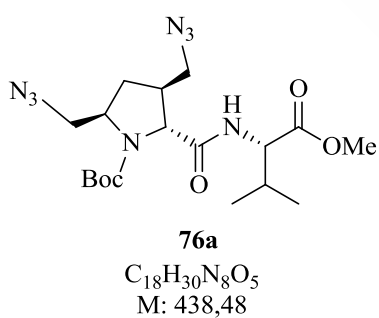
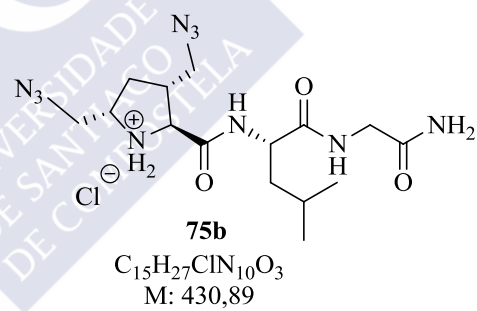
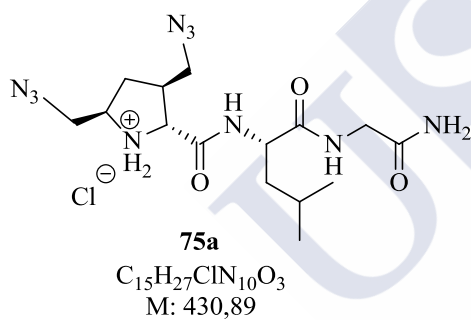
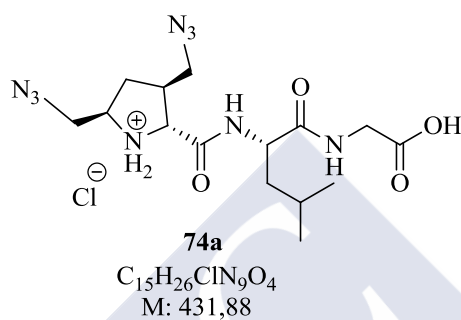
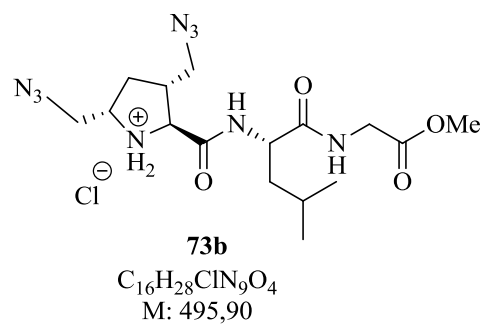
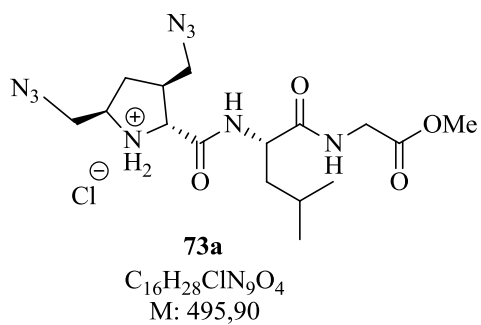
72a

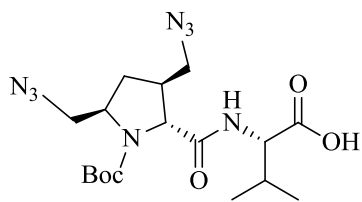
$C_{20}H_{34}N_{10}O_5$
M: 494,55



72b

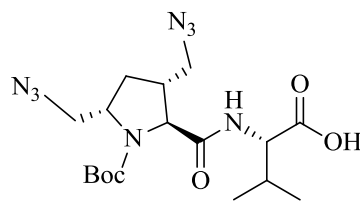
$C_{20}H_{34}N_{10}O_5$
M: 494,55





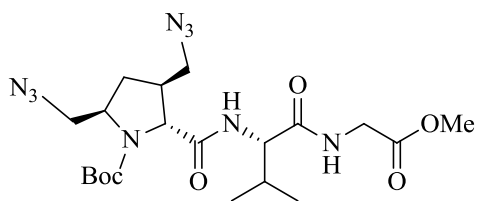
77a

$C_{17}H_{28}N_8O_5$
M: 424,45



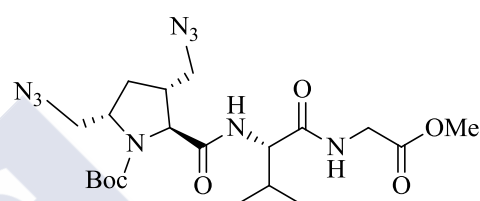
77b

$C_{17}H_{28}N_8O_5$
M: 424,45



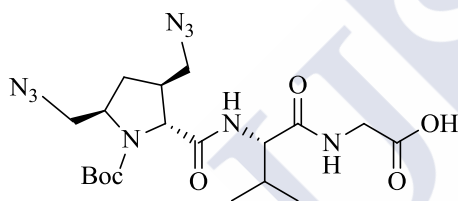
78a

$C_{20}H_{33}N_9O_6$
M: 495,53



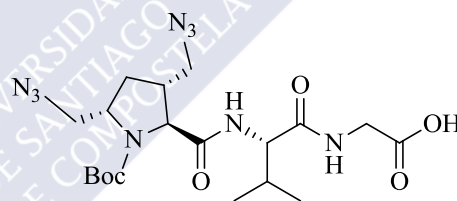
78b

$C_{20}H_{33}N_9O_6$
M: 495,53



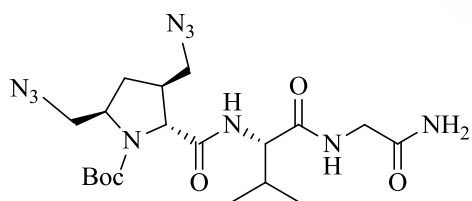
79a

$C_{19}H_{31}N_9O_6$
M: 481,51



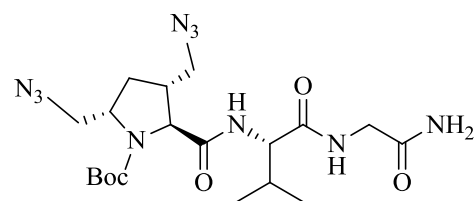
79b

$C_{19}H_{31}N_9O_6$
M: 481,5



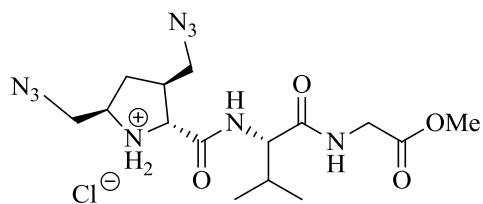
80a

$C_{19}H_{32}N_{10}O_5$
M: 480,52



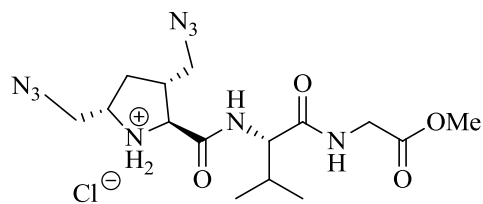
80b

$C_{19}H_{32}N_{10}O_5$
M: 480,52



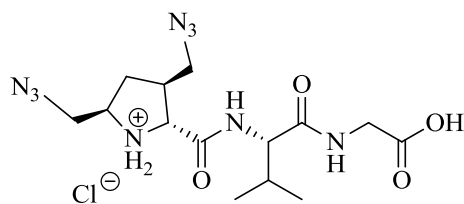
81a

$C_{15}H_{26}ClN_9O_4$
M: 431,88



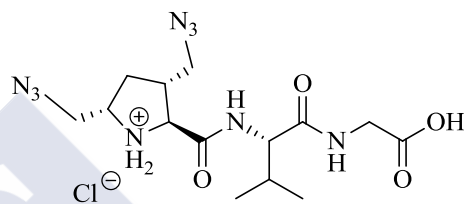
81b

$C_{15}H_{26}ClN_9O_4$
M: 431,88



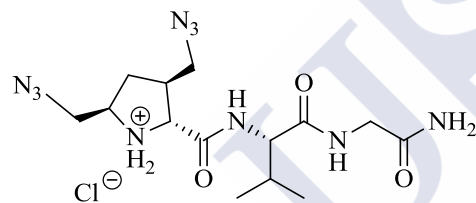
82a

$C_{14}H_{24}ClN_9O_4$
M: 417,85



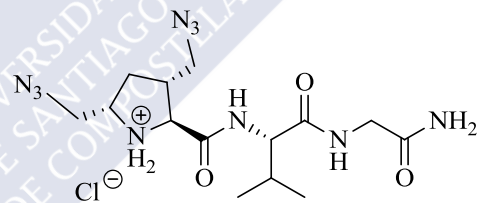
82b

$C_{14}H_{24}ClN_9O_4$
M: 417,85



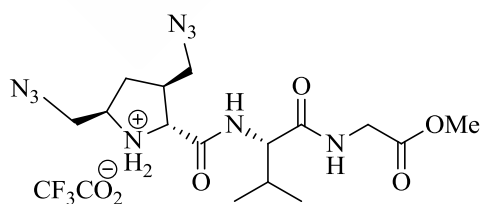
83a

$C_{14}H_{25}ClN_{10}O_3$
M: 416,87



83b

$C_{14}H_{25}ClN_{10}O_3$
M: 416,87



84a

$C_{17}H_{26}F_3N_9O_6$
M: 509,44



IV. SUMMARY



Synthesis of novel 3,5-bis(substituted)proline derivatives

In recent years small heterocyclic molecules have attracted considerable attention and, amongst these, proline-derived structures constitute a particularly interesting class of compound.^{1,2} In this context, the cyclic α -amino acids are synthetically interesting targets because they can be used as building blocks for the synthesis of peptide mimetic structures with biological activity.³

Various biological activities, have been reported for these compounds, ranging from antiviral activities to neuroprotective properties in different animal models of neurodegenerative processes. In our area of interest the most bioactive peptides have proline in their sequence and, the important roles of the neuropeptides GPE (glycyl-L-prolyl-L-glutamate)⁴ and PLG (L-prolyl-L-leucyl-glycinamide)⁵ (Figure 1) in the central nervous system highlighted the possibility of using these species and/or their analogues to treat neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's chorea.

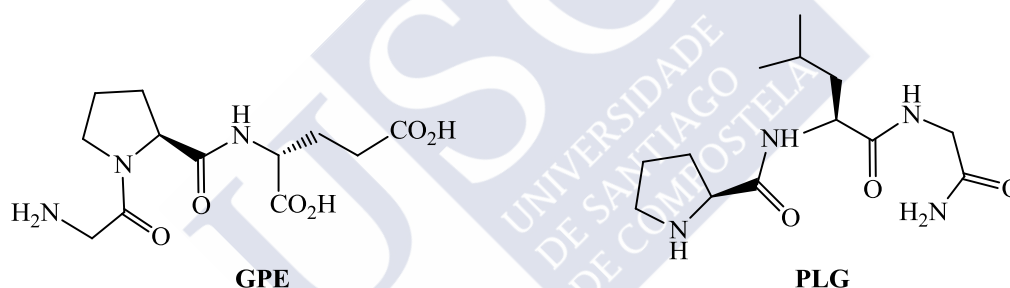
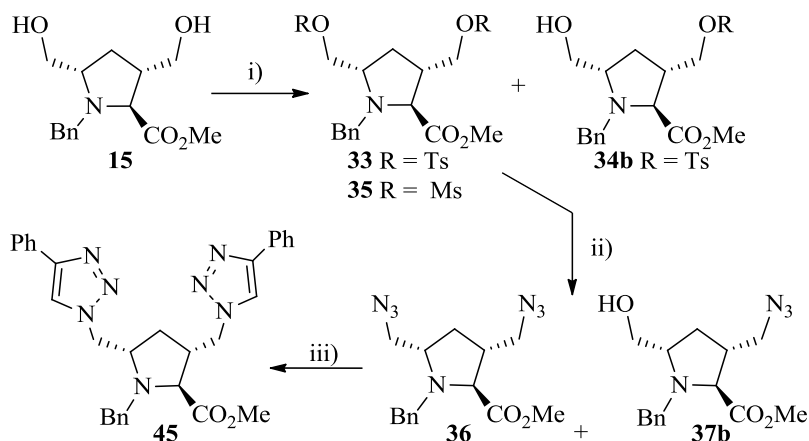


Figure 1. Structure of neuropeptides GPE and PLG.

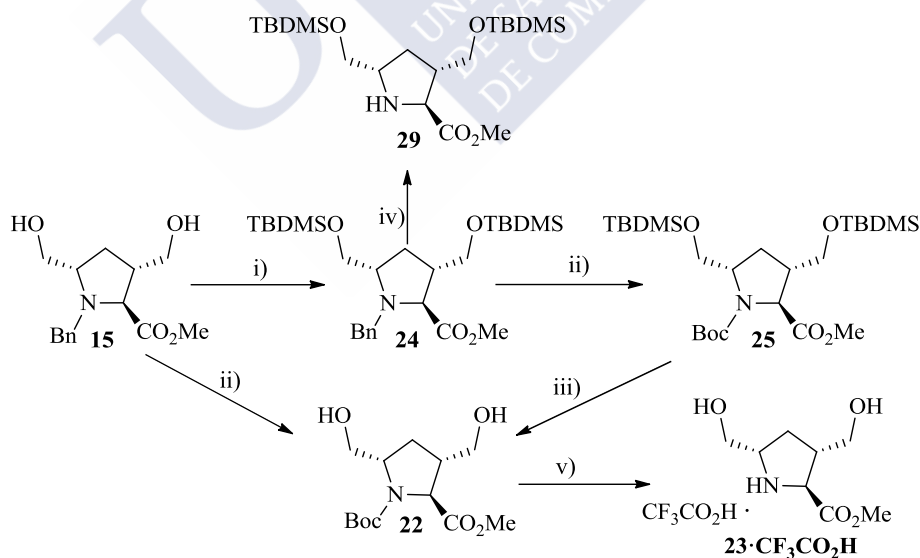
From a structural point of view, the most commonly used proline mimetics are derivatives of proline itself with a wide range of substituents.⁶ This situation has contributed to the growing interest in finding short and efficient synthetic routes to substituted cyclic amino acids and, for this reason, the first objective of the work described here was the synthesis of 3,5-disubstituted proline derivatives as potential scaffolds in the synthesis of peptides with pharmacological activity.⁷

In this context, we have prepared 3,5-disubstituted proline analogues (Schemes 1–5). The synthesis of key intermediate **15** was accomplished by an imino-Diels–Alder reaction followed by a two-fold hydroxylation and oxidative cleavage, as described previously.⁸



Scheme 1. Reagents, conditions and yields: (i) a) MsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , DMAP, rt, 1 h, **35** (64%); b) TsCl , pyridine, CH_2Cl_2 , rt, 4 h, **33** (22%) + **34b** (9%); (ii) NaN_3 , DMF, 90°C , 14 h, **36** (41%) + **37b** (13%) from **33**, and **36** (54%) from **35**; (iii) phenylacetylene, CuI , DIEA, toluene, $t\text{-BuOH}$, 70°C , 13 h, 54%.

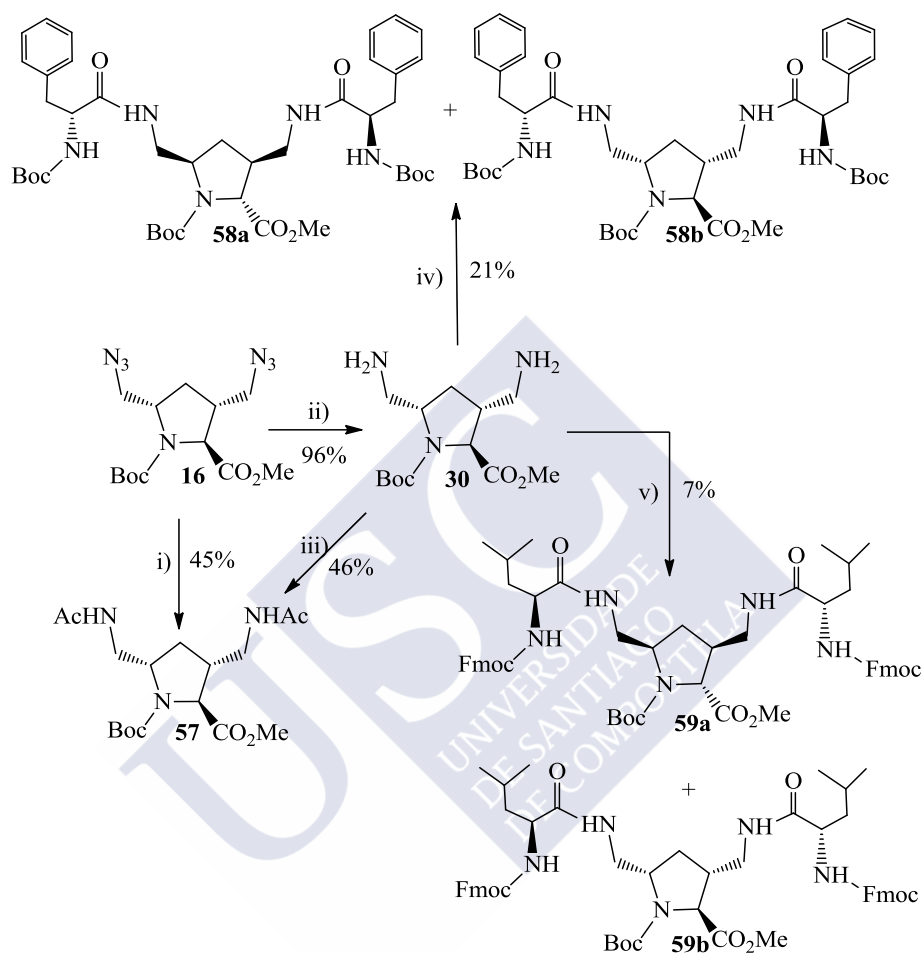
All efforts to improve the low yields obtained for these derivatives met with limited success. As a result, it was decided to change the protecting group on the amino group of the proline, with *tert*-butoxycarbonyl (Boc) used instead of benzyl (Scheme 2). One of the reasons for this change was that the presence of an electron-withdrawing group on the nitrogen of the pyrrolidine ring would increase the reactivity of the hydroxymethyl group.



Scheme 2. Reagents, conditions and yields: (i) TBDMSCl , imidazole, CH_2Cl_2 , rt, 2 h, 92%; (ii) 20% $\text{Pd(OH)}_2/\text{C}$, H_2 1 atm, Boc_2O , EtOAc, rt, 18 h, **25** (77%); **22** (96%); (iii) 1M TBAF in THF, rt, 1 h, **22** (88%); (iv) 20% $\text{Pd(OH)}_2/\text{C}$, H_2 1 atm, EtOAc, rt, 144 h, **29** (42%); (v) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 6 h, **23·CF₃CO₂H** (48%).

With the above aims in mind, diol **22** was prepared by the routes shown in Scheme 2 and it was found that *N*-Boc derivatives are better intermediates than *N*-benzyl derivatives in terms of cleanness and overall yield of the reaction sequence (**15**→**22**→**38**→**16**→**46a**). In this

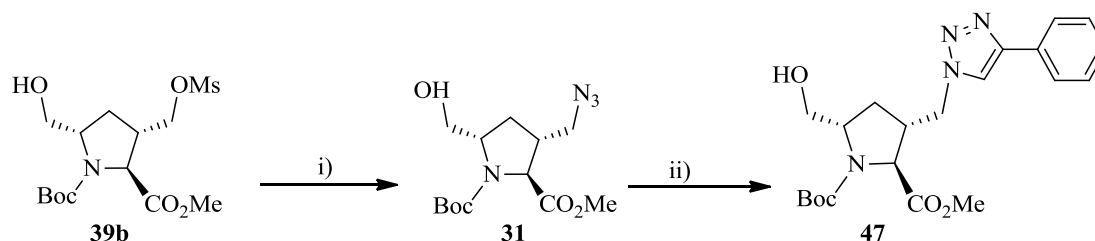
With the aim of contributing to the growing interest in finding substituted cyclic amino acids,⁹ we also prepared other 3,5-disubstituted methyl proline derivatives, such as the diamine **30** and several 3,5-diacylaminomethyl proline derivatives **57–59** (Scheme 4).



Scheme 4. Reagents and conditions: i) a) Ph_3P , THF, 70 °C, 5.5 h; b) H_2O , 40 °C, 15 h; c) Ac_2O , CH_2Cl_2 , pyridine, rt, 4 h; ii) H_2 , Pd-C 10%, EtOAc, rt, 18 h; iii) Ac_2O , pyridine, rt, 6 h; iv) *N*-Boc-D-Phe-OH, THF, HOBt, DIC, rt, 3 h; v) *N*-Fmoc-L-Leu-OH, THF, HOBt, DIC, rt, 4 h.

The Staudinger–Vilarrasa coupling constitutes an interesting pathway for the synthesis of amides.¹⁰ This approach is presented as an attractive water-compatible variant of a modified Staudinger coupling and it, involves an organo-azide and a suitably activated *N*-protected α -amino acid or unprotected α -hydroxy acid. This coupling is advantageous from a synthetic point of view as it gains one synthetic step and is not sensitive to the chemical stability of the amino derivative. For these reasons we assessed this reaction for the synthesis of the diacetamide ester **57** by following a previously described methodology in which Ph_3P and Ac_2O ¹¹ or *n* Bu_3P , HOBt, DIC and Boc-Gly-OH, respectively, were used.¹²

For the synthesis of triazole derivative **47** (Scheme 5), compound **39b** was treated with NaN_3 in dimethylformamide at 90 °C to give the monoazide ester **31**, which was used in a Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition¹³ with phenylacetylene in the presence CuI.



Scheme 5. Reagents, conditions and yields: i) NaN_3 , DMF, 90 °C, 4 h, 88%; ii) ethylbenzene, CuI, DIEA, *tert*-butanol, 70 °C, 22 h, 70%.

The structures of **40** and **47** were unequivocally determined by X-ray analysis of two single crystals (Figure 2).¹⁴ These results confirmed the relative configuration of the key intermediates **38** and **39b** and, consequently, of the complete series of related derivatives.

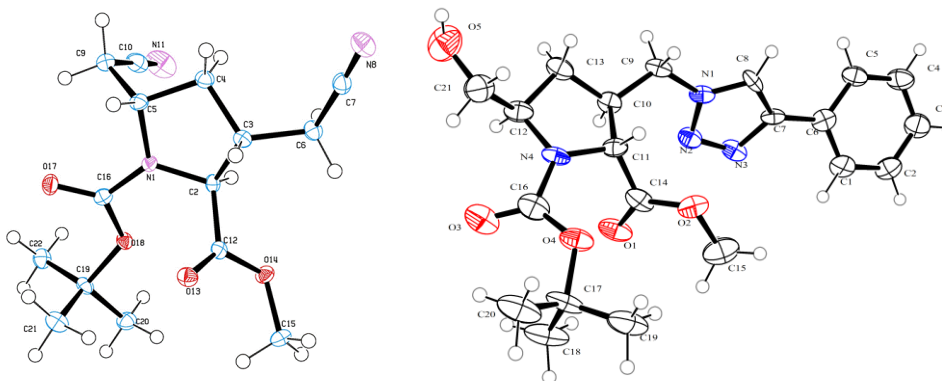


Figure 2. X-ray crystallographic structures of compounds **40** and **47**.

Synthesis of L-prolyl-L-leucyl-L-glycinamide (PLG) modified in the L-proline or L-proline and L-leucine scaffolds

The structural simplicity of the neuropeptide L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (PLG) makes it a suitable lead molecule for the development of novel strategies for the enlargement of new drugs that have sufficiently low molecular weight and lipophilicity to cross the blood-brain barrier.

PLG, also known as melanocyte-stimulant hormone release-inhibiting factor has been shown to possess a variety of pharmacological activities in the central nervous system.⁵ PLG and its analogue (3*R*)-[(2*S*)-pyrrolidinylcarbonyl]amino-2-oxo-1-pyrrolidineacetamide (PAOPA) (Figure 3) modify dopaminergic neurotransmission by acting as allosteric modulators of the dopamine (DA) D₂ receptor. These compounds have been shown to increase agonist binding to DA D₂ receptors without affecting antagonist binding, and they also prevent conversion of high-affinity state DA receptors (D₂ High) to their low-affinity state (D₂ Low).^{15,16}

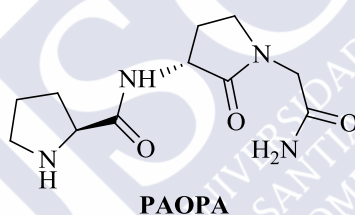


Figure 3. Structure of PAOPA.

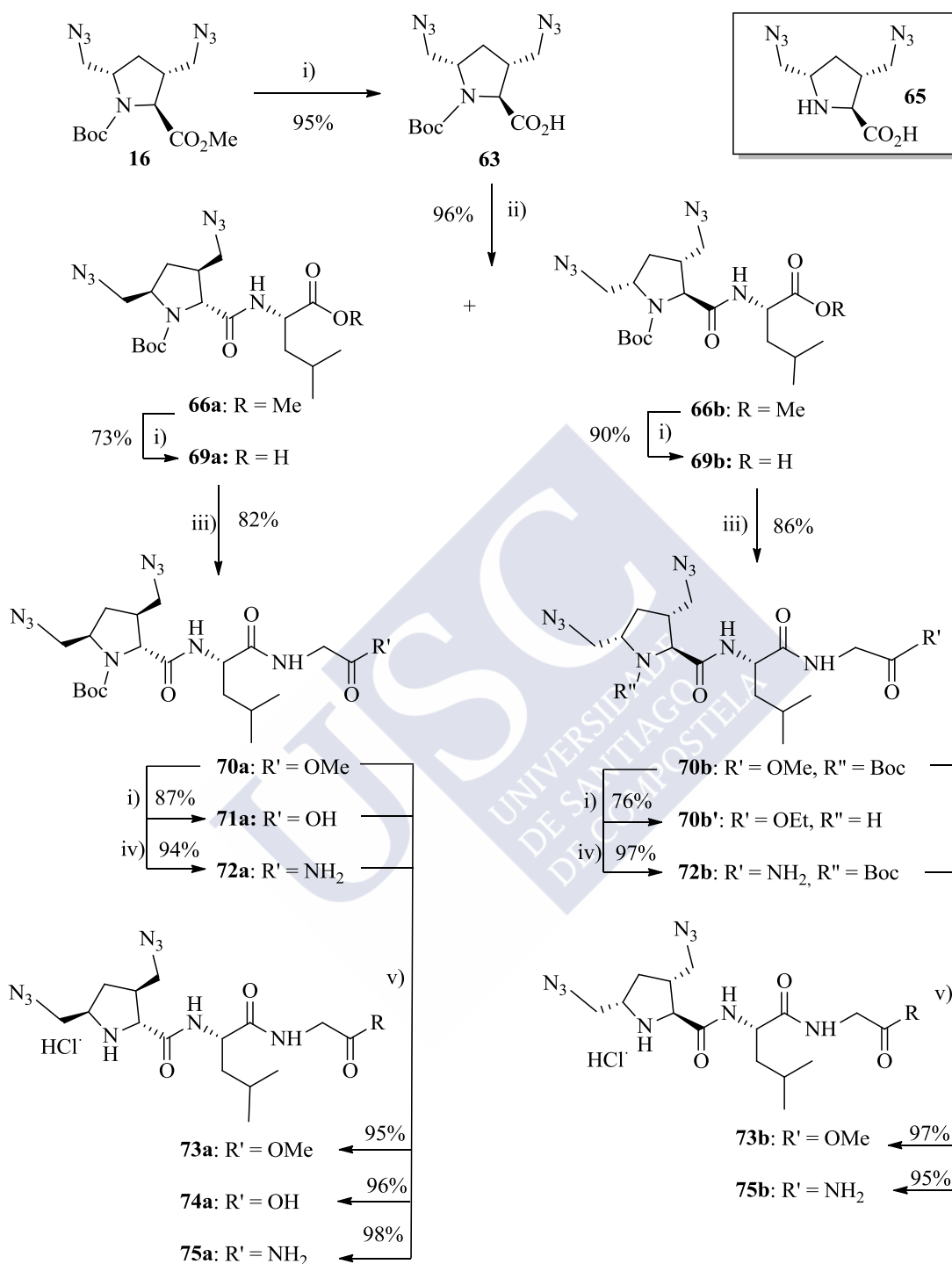
The precise mechanism of action behind PLG's ability to modulate the dopamine receptor is unclear, but studies with different photoaffinity-labelling ligands¹⁷ show activity in enhancing the binding of the dopamine D₂ receptor agonist [³H]-*N*-propylnorapomorphine ([³H]NPA). These ligands serve as useful probes in delineating the allosteric binding site on the dopamine D₂ receptor and in identifying the residues within the PLG binding site where the interactions take place. Studies carried out on cell lines transfected with human dopamine receptor subtypes have shown that PLG and PLG peptide mimetics enhance agonist binding to the D_{2S}, D_{2L}, and D₄ subtypes.¹⁸ The actions of PLG appear to be specific towards dopamine receptors because PLG does not interact with other aminergic receptors such as α -adrenergic,^{16a} serotonergic¹⁹ or GABA-ergic²⁰ receptors.

We embarked on a synthetic programme focused on the modification of the amino acid residues in order to investigate the importance of the different amino acid residues in PLG. Several analogues were modified at either L-Pro or the L-Pro-L-Leu peptide bond. The general synthetic strategy involved the reaction of a carboxylic acid with an amine to give an amide – a

process that requires activation of the carboxylic acid, which is often carried out through an active ester that is normally prepared in situ by the use of carbodiimides or onium salts. In general, amide bond formation mediated by uronium salts and other onium salts involves two steps: activation, in which the coupling reagent reacts with an *N*-protected amino acid to form an active carboxyl, and coupling, whereby the active carboxyl reacts with the amino component to form the peptide bond.²¹ The current reagents of choice for peptides bond formation include aminium/uronium derivatives, such as 2-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate] (TBTU),²² which was the coupling agent used (Schemes 6 and 7) for the formation of the peptidic bond between the diazide acid **63** (prepared from **16**) and L-leucine or L-valine methyl ester hydrochlorides and the subsequent synthesis of the PLG mimics.

The synthetic route for peptide mimetics of PLG **73–75** is shown in Scheme 6. The conversion of methyl ester **16** to carboxylic acid **63** was practically quantitative on using LiOH in a mixture of THF and H₂O at room temperature. However, small deviations in the acidification process (pH below 4) led to a mixture of compounds **63** and **65**, from which a small amount of the latter was separated by crystallization. The acid **63** was coupled to L-leucine methyl ester hydrochloride using TBTU in CH₂Cl₂ with DIEA (diisopropyl ethyl amine) to give an excellent yield (96%) of the mixture of diastereoisomers **66a** and **66b**, which were separated by flash column chromatography.

The hydrolysis of **70b** with LiOH again showed the high lability of the carbamate group; in reactions where the pH was equal to 4 during the acidification process with 1 M H₂SO₄, the Boc protective group was lost and simultaneous transesterification occurred. In this case, the ethyl ester **70b'** was isolated after the reaction work-up (extraction in hot ether/ethanol of the dry residue from the reaction mass).



Scheme 6. i) LiOH, THF/H₂O, rt; ii) L-Leucine methyl ester hydrochloride, TBTU, DIEA, CH₂Cl₂, 15 h, rt; iii) glycine methyl ester hydrochloride, TBTU, DIPEA, CH₃CN, 17 h, rt; iv) NH₃, MeOH; v) 4 N HCl in dioxane, 3 h, rt.

The replacement of the amino acid L-leucine by L-valine for the formation of the dipeptide was achieved by a similar synthetic route (Scheme 7). This approach was used to prepare a new family of PLG mimics (compounds **81a–83a**, **81b–83b**) that are lower

homologues by one carbon atom. Once again, the first coupling reaction in this case was between carboxylic acid **63** and L-valinyl methyl ester hydrochloride, and it was possible to resolve the two dipeptide diastereoisomers **76a** and **76b**.

The absolute configuration of dipeptides **66a** and **76a** were unequivocally determined by X-ray analysis of two single crystals (Figure 4).²³ This analysis confirmed the absolute configuration of the other stereoisomers **66b** and **76b** and, consequently, of each of the compounds (**69–75** and **77–83**) derived from the four aforementioned stereoisomers.

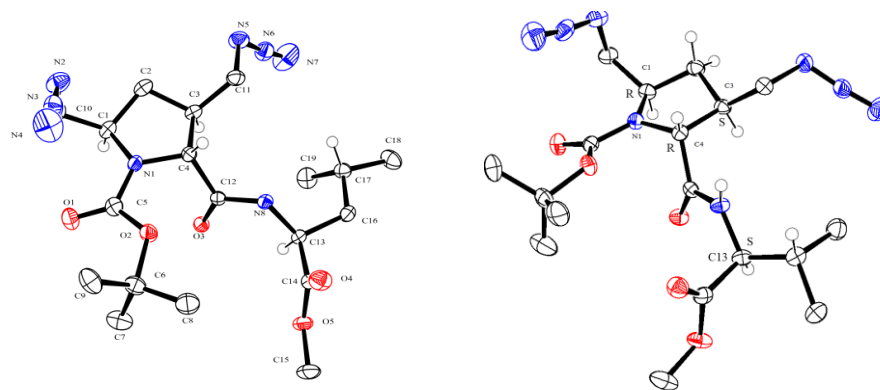
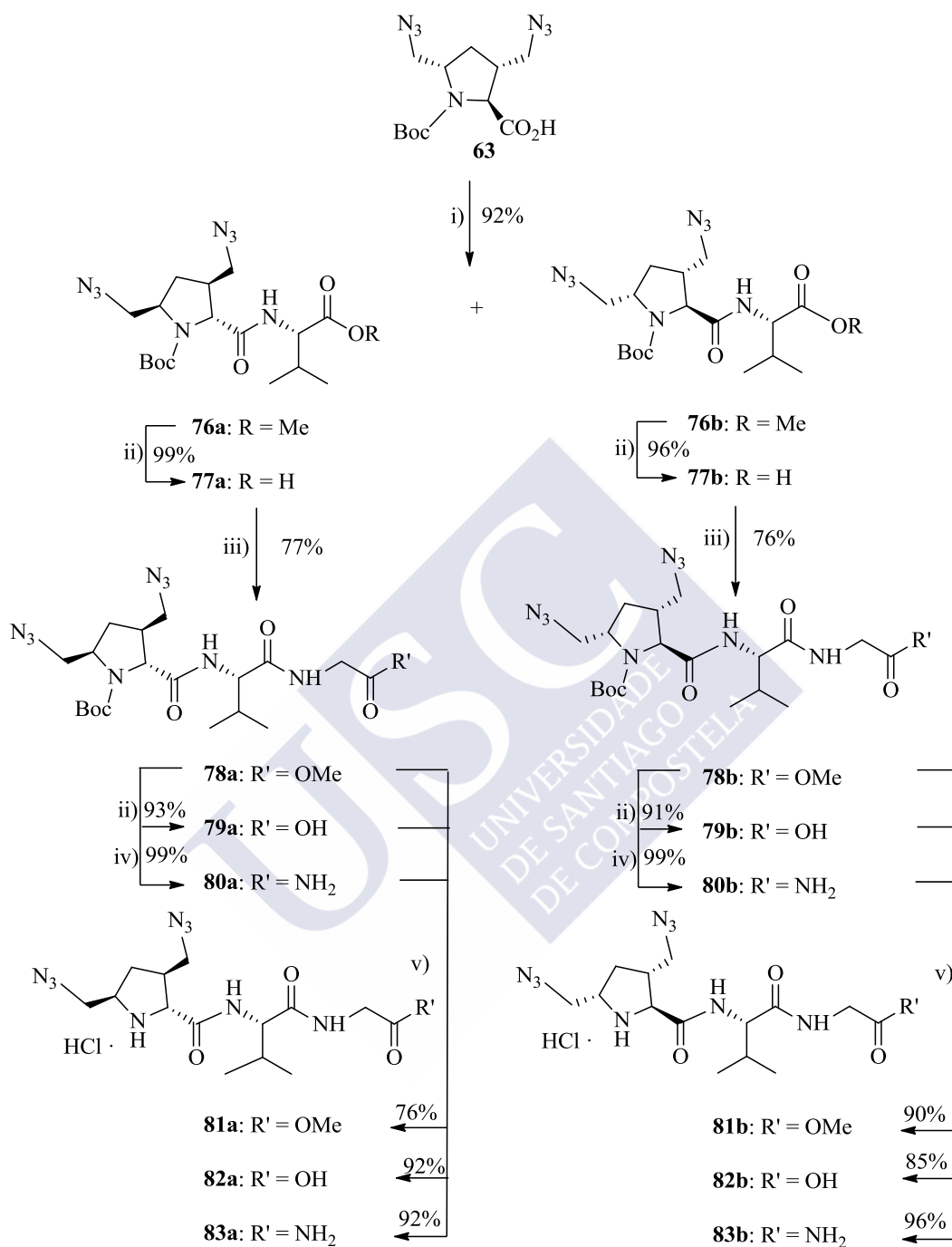


Figure 4. X-ray crystallographic structures of compounds **66a** and **76a**.



Scheme 7. i) L-valine methyl ester hydrochloride, TBTU, DIPEA, CH₂Cl₂, 15 h, rt; ii) LiOH, THF/H₂O, rt; iii) glycine methyl ester hydrochloride, TBTU, DIPEA, CH₃CN, 17 h, rt; iv) NH₃, MeOH, rt; v) 4 N HCl in dioxane, 3 h, rt.

Eleven novel PLG mimetics based on a 3,5-disubstituted proline scaffold were tested for their ability to potentiate the binding of the dopamine receptor agonist *N*-propylnorapomorphine ([³H]NPA) to cloned human dopamine D₂ receptors, as described by Verma et al.¹⁸

All derivatives significantly ($P < 0.05$; ANOVA test; post-hoc Dunnett T3 test) increased [^3H]NPA for binding at least one of the concentrations evaluated. Of the new compounds, derivatives **82b** and **83b** showed the most similar profiles to PLG, with increases of [^3H]NPA binding of around 30–40% and concentrations between 10^{-12} and 10^{-9} M. These results show that the effect is similar to that of PLG in this assay and provides evidence that these compounds are acting as allosteric modulators of dopamine D_2 receptors.



Synthesis of proline-modified analogues of glycine-L-proline-L-glutamic acid (GPE)

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of plaques containing β -amyloid ($A\beta$) and neuronal loss.²⁴ In the brain of patients with AD the somatostatin (SRIF) level is diminished in the temporal cortex.²⁵ The effects of SRIF are mediated by five SRIF receptor subtypes coupled through G proteins to different signal transduction pathways, which are located in diverse brain areas including the temporal cortex. A marked loss of SRIF receptor has been reported in the cortex of AD patients²⁶ and various approaches have been tested to block $A\beta$ toxicity and diminish the progression of AD.

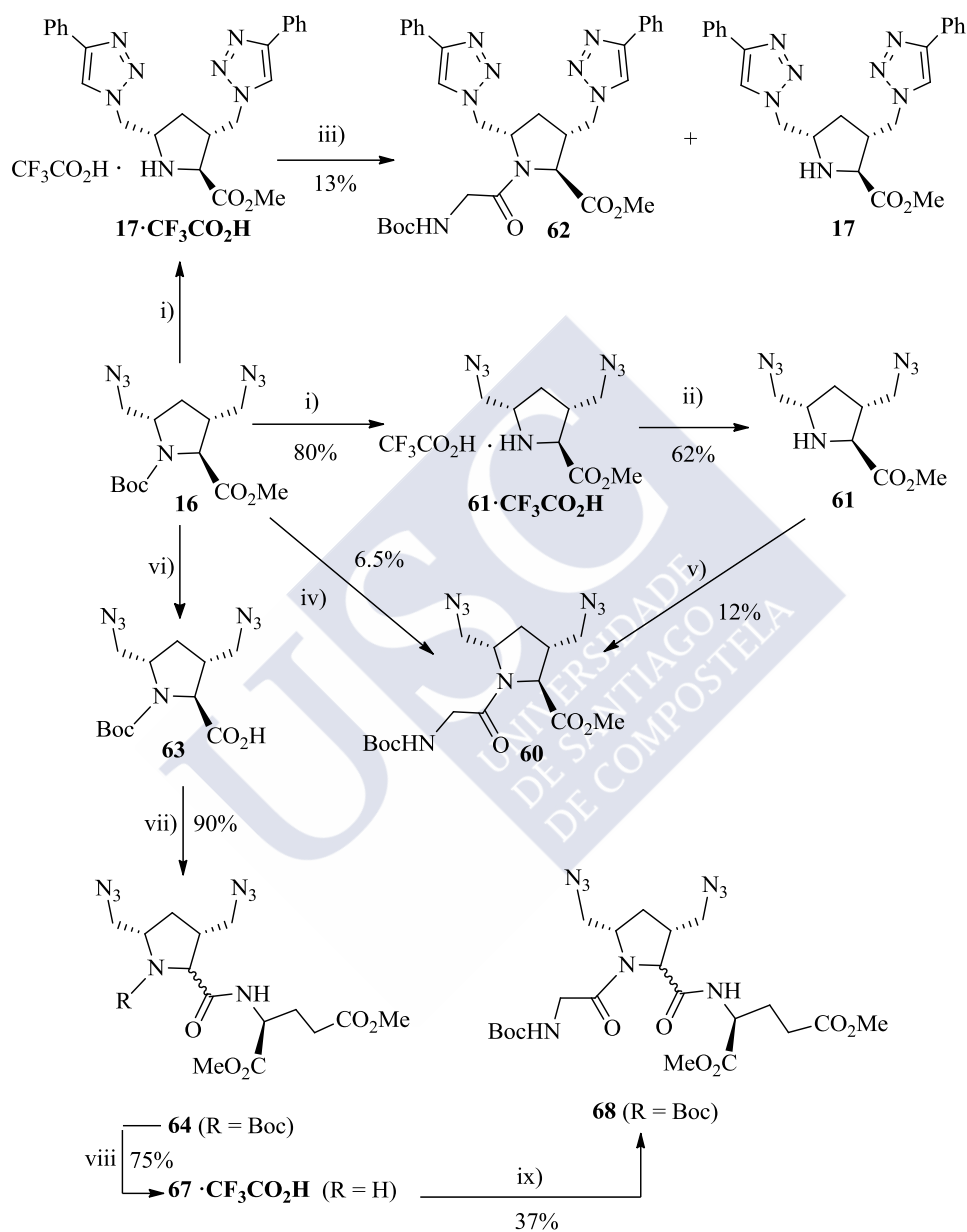
The insulin-like growth factor-I (IGF-I) plays an important role in brain development and is strongly expressed during recovery after a hypoxic-ischemic injury, but the use of this factor in AD is restricted due to its limited ability to cross the blood-brain barrier and also because of potential mutagenic effects.²⁷ However, IGF-I is cleaved in brain into des-(1-3)-IGF-I and the *N*-terminal tripeptide Gly-Pro-Glu (GPE),²⁸ whose small size and stability in the CNS make it a good candidate for use in clinical therapies. Indeed, the administration of GPE following ischemic brain injury reduces apoptosis and inhibits microglial proliferation²⁹ GPE also showed a protective effect on the SRI system in the temporal cortex of $A\beta$ 25–35 treated rats.³⁰

The knowledge gained to date indicates that GPE acts as a survival factor against $A\beta$ insult in brain and suggests a possible new therapeutic strategy for the treatment of CNS injuries and neurodegenerative disorders. However, the poor pharmacological profile of this compound highlights the need to develop better analogues.

Several analogues of GPE have previously been synthesised with modifications at the side chains of either the L-glutamic acid,³¹ glycine³² or L-proline³³ residues in order to explore the structure-activity relationships (SAR) of GPE and to identify analogues with better neuroprotective activities than the natural tripeptide.

With the above information in mind, we embarked on a synthetic programme focused on the modification of the L-proline residue of GPE with the aim of investigating its importance in terms of neuroprotective activities. The general synthetic strategy employed involved the preparation of several modified proline residues, which were then coupled to *N*-Boc-glycine-OH and glutamic dimethyl ester hydrochloride.

The peptide couplings to the *N*-terminus of the sterically hindered proline esters **17** and **61** proved to be extremely difficult (Scheme 8) and even highly efficient peptide coupling reagents failed to give the desired dipeptides in reasonable yield.



Scheme 8. Reagents and conditions: i) Reference 7; ii) NaHCO₃, 2 h, rt; iii) Boc-Gly-OH, *i*-BuOCOCl, Et₃N, THF, H₂O, 20 h, rt; iv) a) Boc-Gly-OH, TFA, CH₂Cl₂, 2 h; b) BOP-Cl, DIEA, CH₂Cl₂, 17 h, rt; v) Boc-Gly-OH, TBTU, DIEA, CH₂Cl₂, 63 h, rt; vi) LiOH, THF, H₂O, rt; vii) L-glutamic dimethyl ester hydrochloride, TBTU, DIEA, CH₂Cl₂, 16 h, rt; viii) TFA, CH₂Cl₂, 4 h, rt; ix) Boc-Gly-OH, BOP-Cl, Et₃N, CH₂Cl₂, 72 h, rt.

In an alternative approach the carboxylic acid **63** was coupled with glutamic dimethyl ester hydrochloride to give dipeptide **64** in a much more satisfactory yield. However, this process gave a mixture of diastereomers **64**, the resolution of which proved impossible by

column or thin layer chromatography. The subsequent coupling of **67**·CF₃CO₂H with Boc-glycine enabled the isolation of a mixture of diastereomers **68**, which also proved impossible to resolve by the same chromatographic techniques.

In an effort to overcome these obstacles, and at the same time to evaluate the influence that the protective group has on the outcome of the coupling reaction the reactions of **67**·CF₃CO₂H with other carbamates of glycine, i.e. fluorenylmethyloxy carbamate (Fmoc) and benzyloxy carbamate (Z), were carried out under similar conditions to those employed to the preparation of **68**. In these cases, the reactions led to complex mixtures of compounds in which the presence of the corresponding tripeptides was detected (¹H NMR). However, these mixtures proved extremely difficult to purify.



Synthesis of 1'-homoisoazanucleoside structures by microwave-assisted 1,3-dipolar cycloaddition

Triazole units are heterocyclic structural motifs that have considerable medicinal and agrochemical potential. For example, the standard therapy for treating hepatitis C is based on the combination of pegylated interferon alpha (pIFN- α)³⁴ with ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1*H*-1,2,4-triazole-carboxamide),³⁵ a triazole nucleoside analogue. This treatment inhibits inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), a key enzyme in de novo purine nucleotide biosynthesis.

The hepatitis C virus (HCV) has infected more than 170 million people worldwide and it is a major global health problem. The HCV viral RNA genome encodes a polyprotein that consists of structural and non-structural (NS) proteins. The chymotrypsin-like serine protease is located in the *N*-terminus of the NS3 non-structural protein and this has been a valuable target for several derived inhibitors, some of which, namely boceprevir and telaprevir, were approved by the FDA for use in the United States in May 2011 for the treatment of hepatitis C in combination with ribavirin and pegylated interferon alpha (pIFN- α).

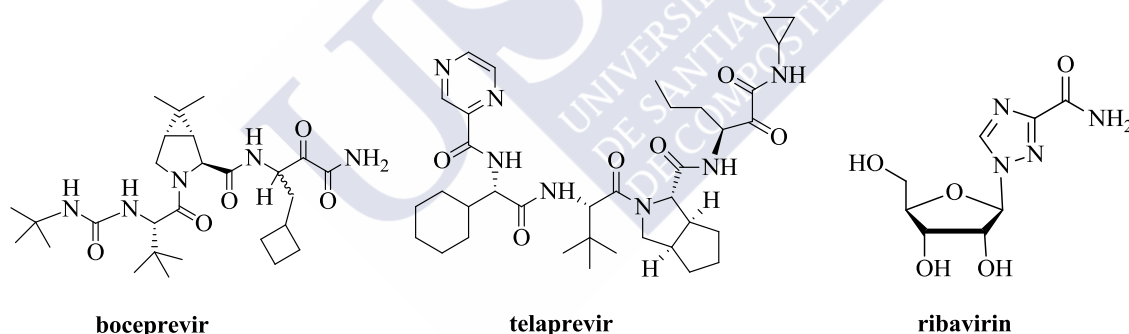


Figure 5. Structure of antiviral agents employed for the treatment of hepatitis C.

Azanucleosides have received significant attention in the search for new antiviral, antineoplastic, and antifungal agents. In these nucleoside analogues, the furanose ring is replaced by a nitrogen heterocycle; in some cases the base has also been modified and its position in the ring has been changed.³⁶ A large number of 1,2,3-triazole derivatives have also been reported as potent antiviral, antimicrobial or antiproliferative agents³⁷ and among these are some interesting examples of 1,2,3-triazole nucleosides.³⁸ In the field of carbonucleoside analogues the synthesis and biological evaluation of compounds that contain a 1,2,3-triazole ring as a nucleobase have also been reported recently.³⁹

We prepared several new 1'-homoisoazanucleosides as a logical combination of the two lines of research within our group; the first area is dedicated to the development of new

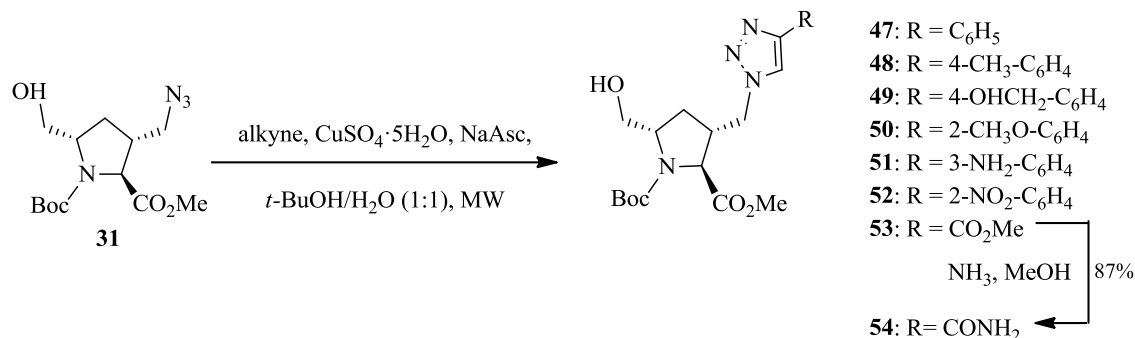
carbocyclic nucleoside analogues⁴⁰ and the second is aimed at the synthesis and utilization of 3,5-disubstituted proline mimetics in the preparation of small peptides.⁴¹ In this way, the proline mimetics were used as scaffolds to obtain new 1'-*homoisoazanucleosides*, which can be studied against various viral infections, including hepatitis C, and different cell lines in order to determine the potential antiviral and/or anticancer properties of this new group of molecules. More recently, 3'-deoxy-4'-azaribonucleosides have shown significant anti-HCV⁴² activity and preliminary biological assays on truncated phosphonated C-1'-branched N,O-nucleosides show that these systems are able to inhibit HIV infection in vitro.⁴³

Since the seminal review by Kolb, Finn and Sharpless, in which the principles of click chemistry were defined,⁴⁴ this new strategy in organic synthesis has been used extensively in the fields of bioconjugation, materials science and drug discovery.⁴⁵ Sharpless and co-workers define click reactions as those that “are modular, wide in scope and easy to perform, high yielding, create only inoffensive by-products (which can be removed without chromatography), are stereospecific, simple to perform and that require benign or easily removed solvents”.⁴⁴ Furthermore, only readily available reagents should be used and they must be insensitive to oxygen and water. Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition of alkynes and azides to yield triazoles is the premier example of a click chemistry reaction.⁴⁶ The dramatic acceleration of azide-alkyne coupling under copper(I) catalysis and the beneficial effects of water^{47,13} mean that this unique connection process redefines the concept of a ‘perfect reaction’.

The synthesis of the 4-substituted-1,2,3-triazolyl 1'-*homoisoazanucleosides* **47–54** (Scheme 9) was initially planned to obtain the target compounds for their potentially interesting biological activities. However different terminal aryl alkynes were to be used as dipolarophiles, in order to study the effect that the presence of electron-donating/withdrawing groups attached to the aromatic ring have on the progress of these cycloadditions, as well as to gain insights into the optimization of the reaction conditions.

Microwave technology has become very important in synthesis and it is reasonable to assert that there are now very few areas of synthetic organic chemistry that have not been shown to be enhanced on using microwave heating; the reaction of azides with alkynes, under microwave irradiation, proceeds cleanly and in high yield.⁴⁸ In order to confirm the enhancements resulting from the application of this methodology for the preparation of other derivatives, methyl (2*R**,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**16**) was treated with ethynylbenzene under the same conditions used for the synthesis of **47**. This led to methyl (2*R**,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3,5-bis-[(4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (**46a**), previously synthesized using a

conventional method (room temperature, 15 h, yield 87%),⁷ in high yield (70 °C, 15 min, yield 92%).



Scheme 9. Microwave-assisted construction of triazoles **47–53**.

Construction of the desired 4-substituted-1,2,3-triazole moiety was achieved in a microwave-assisted process (Scheme 9). As expected, this methodology produced only one of the two possible regioisomers (**47–53**) in good yields (Table 1).

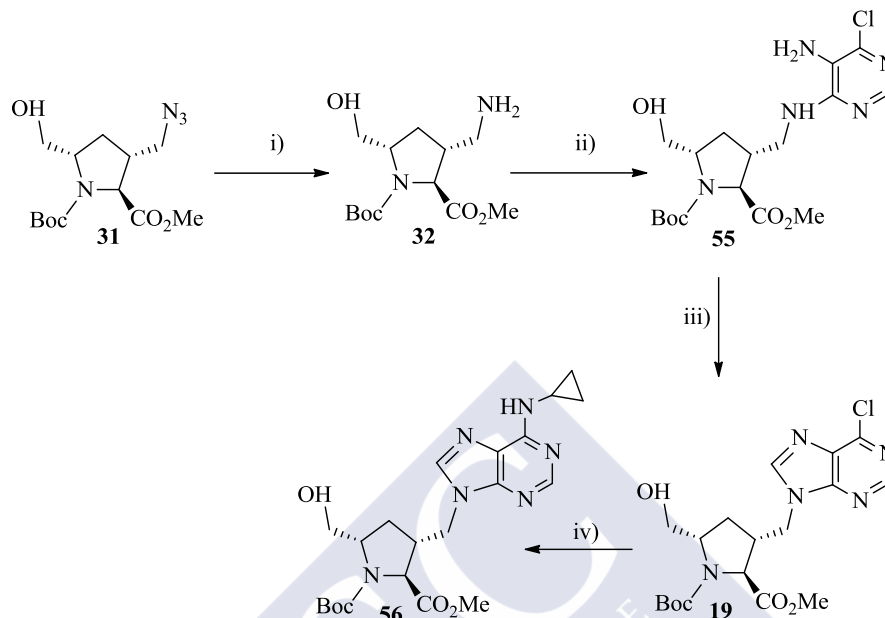
Table 1. Microwave-assisted construction of triazoles **47–53** to 100 W*

Entry	Alkyne	Temp (° C)	time (min)	Yield (%)
1	ethynylbenzene	70	30	47 (92)
2	4-ethynyltoluene	70	55	48 (76)
3	4-ethynylbencyalcohol	70	10	49 (86)
4	2-ethynylanisole	90	60	50 (73)
5	3-ethynylaniline	90	45	51 (84)
6	1-ethynyl-2-nitrobenzene	70	160	52 (38)
7	methyl propiolate	70	15	53 (94)

*The reaction was performed with CuSO₄·5H₂O, sodium ascorbate in *tert*-butanol/H₂O.

Compound **32** obtained from **31** by reduction of the azide group, allowed the preparation of 1'-*homo*isoazanucleosides carriers of more conventional heterocyclic bases. The compounds **19** and **56** were prepared by construction of the base on amino alcohol **32** by condensation with 5-amino-4,6-dichloropyrimidine afforded diamine **55** and cyclization of the

latter with triethyl orthoformate gave **19** (Scheme 10). Finally, compound **19** was heated under reflux with cyclopropylamine to afford **56**.



Scheme 10. Reagents, conditions and yields: (i) H_2 , 10% Pd/C, EtOAc, rt, 18 h, 96%; (ii) 5-amino-4,6-dichloropyrimidine, Et_3N , BuOH, reflux, 24 h, 76%; (iii) a) $\text{HC}(\text{OEt})_3$, 12 N HCl, rt, 24 h; b) 0.5 N HCl, THF, rt, 2 h, 53%; (iv) cyclopropylamine, EtOH, reflux, 7 h, 68%.

Bibliography

1. Martins, M. B.; Carvalho, I. *Tetrahedron* **2007**, 63, 9923.
2. Imming, P.; Sinning, C.; Meyer, A. *Nat. Rev. Drugs. Discov.* **2006**, 5, 821.
3. Karoyan, P.; Sagan, S.; Lequin, O.; Quancard, J.; Lavielle S.; Chassaing, G. *Substituted Prolines: Synthesis and Applications in Structure-Activity Relationship Studies of Biologically Active Peptides*. In *Targets in Heterocyclic Systems. Chemistry and Properties*, Attanasi, O. A. and Spinelli, D. Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2005**, vol. 8, p. 216.
4. Yamamoto, H.; Murphy, L. J. *J. Endocrinol.* **1995**, 146, 141.
5. Mishra, R. K.; Chiu, S.; Chiu, P.; Mishra, C. P. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1983**, 5, 203.

6. (a) Robinson, J. A. *Synlett*, **2000**, 429. (b) Sabol, J. S.; Flynn, G. A.; Friedrich, D.; Huber, E. W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3687. (c) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron-Asymm.* **2000**, 11, 645.
7. Ferreira Da Costa, J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron* **2010**, 66, 6797.
8. Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10951.
9. a) Hruby, V. J.; Li, G.; Haskell-Luevano, C.; Shenderovich, M. *Biopolymers* **1997**, 43, 219; (b) Gante, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1994**, 33, 1699; (c) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1993**, 32, 1244.
10. Mita, T.; Fukuda, N.; Roca, F. X.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *Org. Lett.* **2007**, 9, 259.
11. Chapius, H.; Strazewski, P. *Tetrahedron* **2006**, 62, 12108.
12. Nozaki, S. *J. Peptide Res.* **1999**, 54, 162.
13. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Møndal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.
14. The crystallographic data for compounds **40** and **47** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as Supplementary Publications CCDC 779237 and CCDC 928715, respectively. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.
15. Bhargava, H. N. *Neuropharmacology* **1984**, 23, 439.
16. (a) Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, 50, 960. (b) Mishra, R. K.; Srivastava, L. K.; Johnson, R. L. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **1990**, 14, 821.
17. Ott, M. C.; Costain, W. J.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *Peptide* **2000**, 21, 301.
18. Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J. M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1228.
19. Gulati, A.; Bhargava, H. N. *Pharmacology* **1990**, 41, 98.
20. Miller, L.; Kastin, A. J. *Brain Res. Bull.* **1990**, 25, 917.
21. (a) Humphrey, J. M.; Chabern, A. R. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 224. (b) Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678. (c) Han, S.-Y.;

- Kim, Y.-A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447. (d) Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606.
22. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
23. The crystallographic data for compounds **66a** and **76a** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as Supplementary Publications CCDC 924409 and CCDC 924408, respectively. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.
24. Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. *Neuron*. **2004**, *44*, 181.
25. Reinikainen, K. J.; Soininen, P. J.; Reinikainen, J. *Neurosci. Res.* **1990**, *25*, 576.
26. Cowburn, R. F.; Fowler, C. J.; Garlind, A.; Alafuzoff, I.; Nilsson, L.; Ninblad, B.; Bergstrom, L. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* **1991**, *54*, 748.
27. Górecki, D. C.; Beresewicz, M.; Zablocka, B. *Neurochem. Int.* **2007**, *51*, 451.
28. Sara, V. R.; Carlsson-Skwirut, C.; Drakenberg, K.; Giacobini, M. B.; Håkansson, L.; Mirmiran, M.; Nordberg, A.; Olson, L.; Reinecke, M.; Ståhlbom, P. A.; Sandberg Nordqvist, A. C. *Ann. NY Acad. Sci.* **1993**, *692*, 183.
29. Guan, J.; Thomas, G. B.; Lin, H.; Mathai, S.; Bachelor, D. C.; George, S.; Gluckman, P. D. *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 892.
30. Burgos-Ramos, E.; Martos-Moreno, G. A.; López, M. G.; Herranz, R.; Aguado-Llera, D.; Egea, J.; Frechilla, D.; Cenarruzabeitia, E.; León, R.; Arilla-Ferreiro, E.; Agente, J.; Barrios, V. *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 360.
31. (a) Brimble, M.; Trotter, N. S.; Harris, P. W. R.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 519. (b) Alonso De Diego, S. A.; Muñoz, P.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Martín-Martínez, M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Río, J.; Jimeno, M. L.; García-López, M. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2279. (c) Hung, K.-Y.; Harris, P.W.R.; Brimble, M. A. *Synlett* **2009**, 1233.
32. (a) Lai, M. Y. H.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W. R.; Levi, M. S.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 533. (b) Alonso De Diego, S. A.; Gutierrez-Rodríguez, M.; Pérez de la Vega, M.; Casabona, D.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Río, J.; Jimeno, M. L.; García-López, M. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1392.

33. Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Muir, V. J.; Lai, M. Y. H.; Trotter, N. S.; Callis, D. J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10018.
34. Moussalli, J.; Opolon, P.; Poynard, T. *J. Viral Hepatitis* **1998**, *5*, 73.
35. (a) Witkowski, J. T.; Robins, R. K.; Sidwell, R. W.; Simon, L. N. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1150. (b) Sidwell, R. W.; Huffman, J. H.; Khare, G. P.; Allen, L. B.; Witkowski, J.; Robins, R. K. *Science* **1972**, *177*, 705.
36. (a) Romeo, G.; Chiacchio, U.; Corsano, A.; Merino, P. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3337. (b) Wang, D.; Li, Y.-H.; Wang, Y.-P.; Gao, R.-M.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 41. (c) Boto, A.; Hernandez, D.; Hernandez, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3847.
37. (a) Mingdong, C.; Shijie, L.; Guanpu, Y.; Shiyan, Y.; Xuaoli, D. *Heterocycl. Commun.* **2000**, *6*, 421. (b) Manfredini, S.; Vicentini, C.B.; Manfrini, M.; Bianchi, N.; Rutigliano, A.; Mistiachi, C.; Gambari, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2343.
38. (a) Álvarez, R.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Perno, C.-F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4185. (b) Velázquez, S.; Alvarez, R.; Pérez, C.; Gago, F.; De Clercq, E.; Balzarini J.; Camarasa, M. J. *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 481. (c) Alonso, R.; Camarasa, M. J.; Alonso G.; De las Heras, F. G. *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 105.
39. (a) Joubert, N.; Schinazi, R. F.; Agrofoglio, L.A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11744. (b) Cho, J. H.; Bernard, D. L.; Sidwell, R. W.; Kern E. R.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1140. (c) Pérez-Castro, I.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García, M. D.; López C.; De Clercq, E. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3805. (d) Pérez-Castro, I.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García, M. D.; López C.; De Clercq, E. *ARKIVOC* **2010**, 152.
40. (a) Figueira, M. J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; García, M. D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 967. (b) Nieto, M. I.; Blanco, J. M.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Gómez, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2002**, *21*, 243. (c) García, M. D.; Caamaño, O.; Fernández, F.; López, C.; De Clercq, E. *Synthesis* **2005**, 925. (d) García, M. D.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Pérez, I. *Synthesis* **2006**, 3973.
41. Ferreira da Costa, J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Sampaio-Dias, I. E.; Brea, J. M.; Cadavid, M. I. *J. Med. Chem.*, submitted.
42. Chiacchio, U.; Borrello, L.; Crispino, L.; Rescifina, A.; Merino, P.; Macchi, B.; Balestrieri, A.; Mastino, A.; Piperno, A.; Romeo, G. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4054.

43. Romeo, R.; Carnovale, C.; Giofre, S. V.; Romeo G.; Macchi, B.; Frezza, C.; Marino-Merlo, F.; Pistara, V.; Chiacchio, U. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3652.
44. Kolb, H. C.; Finn M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
45. (a) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249. (b) Mamat, C.; Ramenda, T.; Wuest, F. R. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2009**, *6*, 21. (c) Walsh, J. C.; Kolb, H. C. *Chimia* **2010**, *64*, 29. (d) Agalave S. G.; Maujan S. R.; Pore V. S. *Chem.-Asian J.* **2011**, *6*, 2696.
46. Huisgen, R. *1,3-Dipolar cycloaddition: Introduction, survey, mechanism*, In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Ed. Pawda, A. Wiley, New York, 1984, vol. 1, p. 1.
47. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
48. Caddick, S.; Fitzmaurice, R. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3325.



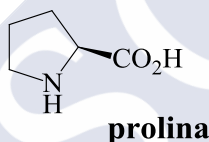
1. INTRODUCCIÓN



1.1. PROLINA-MIMÉTICOS

1.1.1. Antecedentes

El tema central de la química bio-orgánica es desvelar la complejidad estructural y funcional de los sistemas vivos mediante el diseño de modelos sintéticos que mimeticen rasgos estructurales esenciales de las biomoléculas. A la vista del crecimiento del conocimiento en lo que respecta a las relaciones estructura-actividad en compuestos bioactivos, así como acerca del mecanismo del reconocimiento molecular en la comunicación celular, la dedicación al diseño de moléculas terapéuticamente relevantes constituye actualmente uno de los desafíos más fascinantes en el ámbito de la química médica. La independencia de las restricciones que la evolución ha impuesto al crear las moléculas de la vida, permite al químico sintético ir un paso más allá y extender el acervo de las biomoléculas de la naturaleza para estudiar los procesos bioquímicos.¹



Tomemos como punto de partida la prolina (Pro), el único aminoácido cíclico natural y, por ello, una pieza de construcción única de péptidos y proteínas. La presencia del anillo de pirrolidina restringe la libertad conformacional local, lo que conduce a una flexibilidad molecular alterada en los compuestos biológicamente activos que contienen prolina. Por otra parte, el resto de los aminoácidos naturales forman enlaces peptídicos predominantemente *trans*, mientras que la barrera para la isomerización de los enlaces peptídicos de la prolina está disminuida debido a los cambios concomitantes en el plegamiento de la pirrolidina y, adicionalmente, la conformación *trans* está sólo ligeramente favorecida sobre la *cis*. Así, un rasgo bien establecido de las moléculas que contienen prolina es su capacidad de formar enlaces peptídicos *cis* y sufrir fácilmente la isomerización *cis-trans*.²

Una de las maneras de explorar el papel particular de péptidos y proteínas en una gran variedad de procesos biológicos consiste en "sintonizar" sus propiedades estructurales intrínsecas mediante la utilización de moléculas que mimeticen la prolina ("compuestos prolina-miméticos", "pseudoprolinas", ψ Pro).

¹ Tuchscherer, G.; Mutter, M. *Chimia*. **2001**, 55, 306.

² Breznik, M.; Kikelj, D. *Farm. Vestn.* **2000**, 51, 553.

El campo de los compuestos prolina-miméticos abarca desde la síntesis de las unidades estructurales que van a remplazar a la prolina natural, su inclusión, bien como tal unidad o formando ya parte de un andamiaje algo más elaborado en algún tipo de péptido que mimetice al producto natural (péptido o proteína), y finalmente el estudio de las propiedades físico-químicas y biológicas resultantes.

Dentro del amplio tema de los peptido-miméticos, la utilización de prolina-miméticos constituye actualmente un campo activamente investigado con el fin de desarrollar nuevos agentes terapéuticos en campos diversos,³ y buena prueba de ello son algunas patentes registradas por grandes compañías farmacéuticas e institutos de investigación.⁴

Desde el punto de vista estructural, las variaciones de las ψ Pro a incorporar pueden abarcar desde la utilización de análogos en los que se ha remplazado un carbono del ciclo de pirrolidina por un heteroátomo (derivados de oxazolidinas, tiazolidinas, pirazolidinas e imidazolidinas), hasta la de derivados de azabicyclos, o incluso de compuestos con ambos tipos de variaciones. Con todo, las ψ Pro más comúnmente utilizadas son derivados de prolina, con un conjunto más o menos amplio de sustituyentes. En cuanto a las posiciones de los sustituyentes sobre el anillo de prolina, están descritos con estos propósitos los derivados 2-monosustituídos,⁵ 3-monosustituídos,^{6,7,8} 4-monosustituídos^{4c,4d,5,9,10} 5-monosustituídos,^{5b} los 2,3-disustituídos,^{11,12}

³ Dugave, C. *Curr. Org. Chem.* **2002**, 6, 1397.

⁴ (a) Copeland, R. A.; Albright, C. F.; Combs, A. P.; Dowling, R. L.; Graciani, N. R.; Han, W.; Higley, C. A.; Huang, P. S.; Yue, E. W.; Dimeo, S. V. (Dupont Pharmaceuticals Company). WO 01/068145 (**2001**). (b) Jackson, P.; Steiner, J. (Guilford Pharmaceuticals Inc.). WO 01/034594 (**2001**). (c) Wong, C.-H.; Lampe, T. F. J. (Scripps Research Institute). US 6111084 (**2000**). (d) Maring, C. J.; Gu, Y.-G.; Chen, H.-J.; Chen, Y.; DeGoey, D. A.; Flosi, W. J.; Giranda, V. L.; Grampovnik, D. J.; Kati, W. M.; Kempf, D. J.; Klein, L. L.; Krueger, A. C.; Lin, Z.; Madigan, D. L.; Mmcdaniel, K. F.; Muchmore, S. W.; Sham, H. L.; Stewart, K. D.; Stoll, V. S.; Sun, M.; Wang, G. T.; Wang, S.; Xu, Y.; Yeung, M. C.; Zhao, C.; Kennedy, A. (Abbott Laboratories, USA). WO 99/54299 (**1999**). (e) Maring, C. J.; Gu, Y. G.; Chen, H.-J.; Chen, Y.; DeGoey, D. A.; Flosi, W. J.; Giranda, V. L.; Grampovnik, D. J.; Kati, W. M.; Kempf, D. J.; Kennedy, A.; Klein, L. L.; Krueger, A. C.; Lin, Z.; Madigan, D. L.; McDaniel, K. F.; Muchmore, S. W.; Sham, H. L.; Stewart, K. D.; Stoll, V. S.; Sun, M.; Tu, N. P.; Wagenaar, F. L.; Wang, G. T.; Wang, S.; Wiedeman, P. E.; Xu, Y.; Yeung, M. C.; Zhao, C.; Hanessian, S.; Bayrakdarian, M.; Luo, X. (Abbott Laboratories, USA). US 6455571 (**2002**). (f) Hiruma, T.; Kobayashi, K.; Inomata, S. (Shiseido Co. Ltd., JP). WO 03/042176 (**2003**). (g) Kuehne, R.; Oschkinat, H.; Brockmann, C.; Schmalz, H.-G. (Forschungsverbund Berlin e.V., Germany). WO 2008040332 (**2008**). (h) Zhang, K.; Schweizer, F. (University of Manitoba, Can.). WO 2010113035 (**2010**). (i) Kuehne, R.; Oschkinat, H.; Schmalz, H.-G.; Opitz, R.; Mueller, M.; Reuter, C.; Huy, P. (Forschungsverbund Berlin e V, Germany; Universitaet zu Koeln). WO 2013030111 (**2013**).

⁵ Robinson, J. A. *Synlett* **2000**, 429.

⁶ (a) Sabol, J.; Flynn, G. A.; Friedrich, D.; Huber, E. W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3687.

⁷ Khan, M.; Eguchi, M. *Synthesis of Peptides Incorporating β -Turn Inducers and Mimetics*. En Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry, Murray, G.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C. Eds., Thieme, **2003**, vol. E, 22c, p. 695.

⁸ Lorthiois, E.; Marek, I.; Normant, J. F. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2442.

⁹ Beeli, R.; Steger, M.; Linden, A.; Robinson, J. A. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 2235.

¹⁰ Damour, D.; Doerflinger, G.; Pantel, G.; Labaudiniere, R.; Leconte, J.-P.; Sable, S.; Vuilhorgne, M.; Mignani, S. *Synlett* **1999**, 189.

¹¹ Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron-Asymm.* **2000**, 11, 645.

¹² Damour, D.; Barreau, M.; Blanchard, J.-C.; Burgevin, M.-C.; Doble, A.; Pantel, G.; Labaudiniere, R.; Mignani, S. *Chem. Lett.* **1998**, 943.

2,4-disustituidos,^{5,10} 3,4-disustituidos,^{4c,5,8} (también se encuentran trabajos relativos al ácido kaínico y kainoides,^{13,14}) y 3,5-disustituidos.^{8,15} Se han descrito incluso algunos casos de derivados 2,3,4-trisustituidos,¹⁶ 2,4,5-trisustituidos^{4d,10} y 3,4,5-trisustituidos.⁸

A la vista de lo revisado anteriormente, es de destacar la escasa presencia de derivados 3,5-disustituidos; por ello nos pareció pues en nuestro grupo de trabajo un objetivo sintético deseable desde un punto de vista químico-orgánico, y como contribución al desarrollo del tema de los compuestos prolina-miméticos, la puesta a punto de métodos de síntesis de derivados 3,5-disustituidos, con una gran variedad funcional en los sustituyentes, de modo que pudieran ser utilizados como sintones prolina-miméticos.

Buena parte de estos derivados son asequibles por rutas sintéticas que tienen su origen en derivados de los ácidos 2-azabicyclo[2.2.1]ciclohept-5-eno-3-carboxílicos que conducen, de una manera precisa, a compuestos prolina-miméticos con una configuración que depende de la ruta escogida y de la configuración (*endo/exo*; 1*R*/1*S*) del material de partida.

1.1.2. Aplicaciones de los compuestos prolina-miméticos en síntesis de fármacos

Los α -amino ácidos cíclicos son unidades de interés sintético, ya que pueden ser empleados como bloques para preparar estructuras con diferentes actividades biológicas.^{16,17,18,19} Diversos compuestos con una destacada actividad biológica presentan en su estructura alguno de estos aminoácidos, siendo los derivados de prolina los más abundantes.

Por ejemplo, fármacos con una actividad antiviral como el **boceprevir** y el **telaprevir**, han sido aprobados por la FDA en el año 2011, para ser empleados junto con la **ribavirina** y el **interferón alfa pegilado** para el tratamiento de la hepatitis C crónica; estos fármacos pertenecen al grupo de los llamados inhibidores de la *proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C*, enzima que interviene en la fragmentación de una poliproteína viral, en la que se incluyen todas las proteínas virales estructurales y no estructurales, y que ha de ser fragmentada por dicho enzima para que continúe el ciclo de replicación viral. Ambos fármacos, presentan en sus

¹³ Baldwin, J. E.; Fryer, A. M.; Pritchard, G. J. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2588.

¹⁴ Anderson, J. C.; Whiting, M. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6160.

¹⁵ Duan, S.; Moeller, K. D. *Tetrahedron* **2001**, 57, 6407.

¹⁶ Karoyan, P.; Sagan, S.; Lequin, O.; Quancard, J.; Lavielle S.; Chassaing, G. *Substituted Prolines. Synthesis and Applications in Structure-Activity Relationship Studies of Biologically Active Peptides*. En *Targets in Heterocyclic Systems. Chemistry and Properties*, Attanasi, O.A.; Spinelli, D. Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2005**, vol. 8, p. 216.

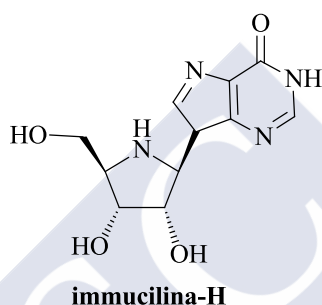
¹⁷ Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. S.; Willians, C. E.; Gluckman, P. D. *Brain Res.* **2001**, 922, 42.

¹⁸ Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R.; Gluckman, P. *Brain Res.* **2000**, 859, 286.

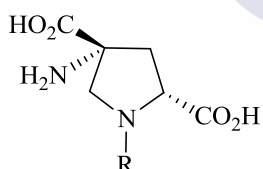
¹⁹ Alexi, T.; Hughes, P. E.; Van Roon-Mom, W. M. C.; Faull, R. M.; Willians, C. E.; Clark, R. G.; Gluckman, P. D. *Exp. Neurol.* **1999**, 159, 84.

Alternativamente, ciertos compuestos prolina-miméticos también facultan la síntesis de nuevos aza o isoazanucleósidos,^{23,24} moléculas con posibles actividades antimaláricas, antivirales y/o anticancerígenas.

Así, por ejemplo la **immucilina-H** es un aza-C-nucleósido que reduce la incorporación de inosina en los ácidos nucleicos y por ello previene el crecimiento de cultivos de *Plasmodium falciparum*, a través de la inhibición de las PNPS (purina nucleósido fosforilasas), lo que conduce a la muerte del parásito por inanición.^{25a} Un estudio reciente indica que la immucilina-H atenúa el crecimiento del *staphylococcus aureus*.^{25b}



Estos compuestos también presentan interés como análogos constreñidos del glutamato, así miméticos de prolina derivados del ácido (2*R*,4*R*)-4-aminopirrolidino-2,4-dicarboxílico pueden funcionar como antagonistas, agonistas parciales o agonistas sobre receptores de glutamato mGluR2, mGluR3, y/o mGluR6.²⁶



R = 2- o 3- o 4-hidroxibencilo, 2- o 3- o 4-carboxibencilo,
2- o 3- o 4-nitrobencilo

²³ Flores, R.; Alibés, R.; Figueredo, M.; Font, J. *Tetrahedron* **2009**, 65, 6912.

²⁴ Piperno, A.; Giofre, S. V.; Iannazzo, D.; Romeo, R.; Romeo, G.; Chiacchio, U.; Rescifina, A.; Piotrowska, D. G. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2798.

²⁵ (a) Kicska, G. A.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Schramm, V. L.; Kim, K. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 3226. (b) Stratton, C. F.; Schramm, V. L. *Bioinformation* **2013**, 9, 9.

²⁶ Mukhopadhyaya, J. K.; Kozikowski, A. P.; Grajkowska, E.; Pshenichkin, S.; Wroblewski, J. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1919.

1.2. ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE LOS TRIPÉPTIDOS L-PROLIL-L-LEUCIL-GLICINAMIDA (PLG) Y GLICIL-L-PROLIL-ÁCIDO L-GLUTAMICO (GPE)

1.2.1. Antecedentes

Los péptidos y proteínas son compuestos de vital importancia en los organismos vivos. De manera arbitraria, se consideran proteínas las cadenas peptídicas que contenga más de 100 aminoácidos y a las de menos de 100 aminoácidos se les denominan péptidos. Unas y otros presentan diferentes funciones en el organismo, las proteínas son “instrumentos moleculares” que materializan la transducción de la información genética constituyendo muchos tejidos y dotándolos de funcionalidad y los péptidos endógenos que juegan papeles biológicos muy importantes, son en su mayoría hormonas, inhibidores y sustratos enzimáticos, neuromoduladores y neurotransmisores.²⁷ En conjunto, ambas familias de compuestos son responsables de gran parte de los procesos biológicos que ocurren en los organismos superiores, ya que muchas de las respuestas orgánicas comienzan por una interacción péptido-proteína, proteína-proteína o sacárido-proteína. Tal y como se define en el concepto de reconocimiento molecular estas interacciones solo serán posibles, si ambas partes poseen secuencias de aminoácidos y conformaciones, que permitan ofrecer de manera complementaria los residuos de los centros activos de la proteína receptora a los del péptido que actúa como ligando. Estos péptidos, tras fijarse a sus correspondientes receptores o enzimas, pueden influir en la comunicación intercelular y controlar una serie de funciones vitales tales como el metabolismo, defensa inmune, digestión, respiración, sensibilidad al dolor, reproducción, comportamiento y niveles electrolíticos. Este amplio rango de actividades justifica el reconocido potencial terapéutico de los péptidos.

1.2.2. Enfermedades neurodegenerativas

1.2.2.1. Aspectos generales

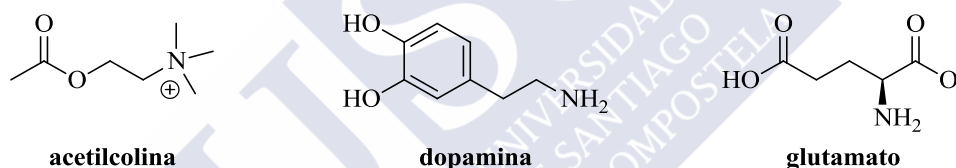
Las enfermedades neurodegenerativas (END) suponen, junto con las enfermedades vasculares y las oncológicas, la principal causa de mortalidad y morbilidad en la población española. En la actualidad, algo más de 800.000 personas están diagnosticadas en nuestro país de alguna END. Se conocen más de 100 enfermedades neurodegenerativas; las de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) son las más significativas, ya sea por su frecuencia o por su gravedad. Estas enfermedades se caracterizan por la pérdida

²⁷ Dutta, A. S. *Advances in Drug Research*, , Testa, B. Ed., Academic Press, London, **1991**, vol. 21, p. 147.

selectiva de poblaciones específicas de neuronas, lo que va a determinar su presentación clínica.^{28,29}

La unidad funcional del sistema nervioso es la neurona, célula especializada que se caracteriza por su excitabilidad y conductibilidad. La excitabilidad de la neurona se debe a pequeñas alteraciones del potencial transmembrana y su conductibilidad permite transmitir la excitabilidad a otras células distintas. Para ello, las neuronas liberan unos compuestos químicos llamados neurotransmisores, que se encuadran esencialmente en tres grandes grupos dependiendo de su naturaleza química: aminos biogénicos, aminoácidos y péptidos.

Los neurotransmisores se liberan en la superficie pre-sináptica y se unen a sus correspondientes receptores de la superficie post-sináptica, produciendo un cambio en el potencial de acción post-sináptico.³⁰ En varias END se han descrito alteraciones en los niveles de algunos neurotransmisores; así, en la EA se ha observado una disminución de acetilcolina y en la EP de dopamina (DA), mientras que en la ELA se ve incrementada la concentración de glutamato.



1.2.2.2. Enfermedad de Parkinson: etiología y tratamiento

La EP es un trastorno del sistema nervioso central (SNC); su origen, como demostró Arvid Carlsson, (Premio Nobel de Fisiología y Medicina del año 2000), se encuentra en un déficit de dopamina en ciertas áreas del cerebro, que comienza, por causas aún desconocidas, con una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriada, lo que a su vez determina una baja concentración de DA.

La enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 con el nombre de parálisis agitante. Es un trastorno crónico y progresivo del SNC, caracterizado por una sintomatología predominantemente motora como bradicinesia, temblor en reposo, rigidez y alteraciones posturales; la rigidez muscular dificulta la marcha, la escritura y el habla.

²⁸ Kovacs, G. G.; Budka, H. *Focus Struct. Biol.* **2009**, 7, 251.

²⁹ Gibrat, C.; Cicchetti, F. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2011**, 35, 380.

³⁰ Waites, C. L.; Garner, C. C. *Trends Neurosci.* **2011**, 34, 326.

Esta enfermedad afecta al 2% de las personas mayores de 65 años, se calcula que actualmente en España viven cerca de 150.000 enfermos diagnosticados, de los que un 15% no supera los cuarenta y cinco años (Sociedad Española de Neurología, año 2012) y más de 30.000 sin diagnosticar. Se estima que en todo el mundo hay alrededor de 4 millones de pacientes diagnosticados, lo que sitúa a la EP como la segunda enfermedad degenerativa más frecuente después del Alzheimer. Respecto a las perspectivas de futuro, se prevé que el número de afectados se duplique hacia el año 2025 y llegue a triplicarse en 2050.³¹

Los principales tratamientos terapéuticos de la enfermedad de Parkinson se basan en la restauración del equilibrio DA/acetilcolina para atenuar los síntomas de la enfermedad. La estrategia fundamental se basa en la potenciación de la actividad dopaminérgica central, bien directamente (levodopa, agonistas y activadores dopaminérgicos) o indirectamente (inhibidores del metabolismo de la DA). En ciertos estadios de la enfermedad se puede recurrir al bloqueo de la actividad colinérgica mediante fármacos antimuscarínicos.

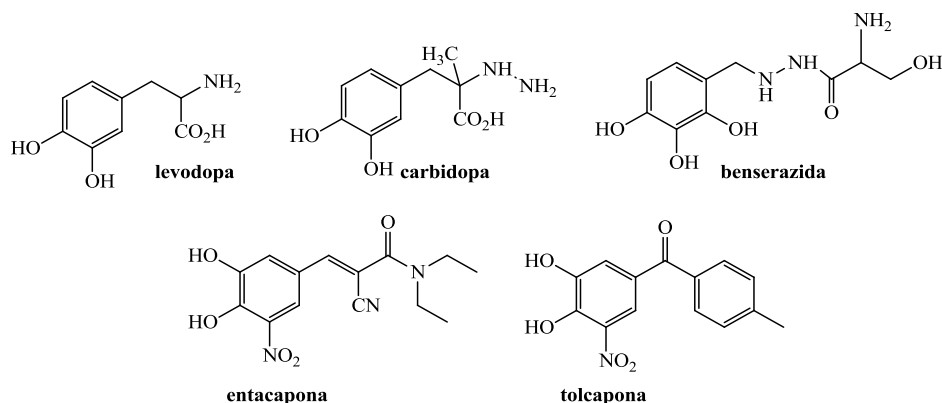
Actualmente, el fármaco más comúnmente administrado es la **levodopa** (L-dopa), precursor endógeno del neurotransmisor DA, que se absorbe a nivel gastrointestinal y atraviesa la barrera hematoencefálica, a diferencia de la dopamina que no la atraviesa, lo que impide su uso oral para el tratamiento de la EP. La levodopa se administra por vía oral junto con la **carbidopa** o la **benserazida**, *inhibidores reversibles de la dopadescarboxilasa* (DDC) periférica (no atraviesan la barrera hematoencefálica), evitándose así la degradación de la L-dopa a nivel periférico y aumentando su paso al SNC en aproximadamente, un 70%.

También fármacos *inhibidores de la o-catecolmetiltransferasa* (COMT), otro enzima que se encarga de metabolizar la L-dopa, se emplean en el tratamiento de la EP. En este grupo de fármacos destacan la **entacapona** y la **tolcapona**, que deben administrarse conjuntamente con levodopa e un inhibidor de la DDC periférica con el fin de elevar la vida media de la dopamina.^{32,33}

³¹ <http://www.fedeparkinson.org>.

³² Forsberg, M. M.; Huotari, M.; Savolainen, J.; Mannisto P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *24*, 503.

³³ Seeberger, L. C.; Hauser, R. A. *Expert Rev. Neurother.* **2009**, *9*, 929.



Sin embargo, la eficacia terapéutica de la levodopa disminuye con el tiempo debido a la progresión natural de la enfermedad y posiblemente también al desarrollo de mecanismos de compensación como la disminución de la actividad de los receptores dopaminérgicos. Además, la levodopa provoca importantes efectos secundarios de desarrollo lento (2–3 años), como la aparición de discinesias (movimientos de agitación involuntarios) o las fluctuaciones en la respuesta antiparkinsoniana (efecto “on-off”).

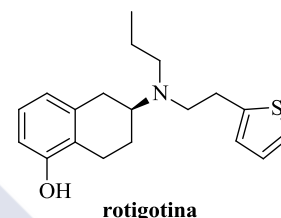
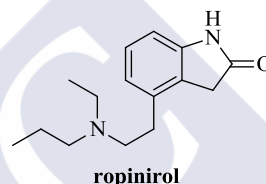
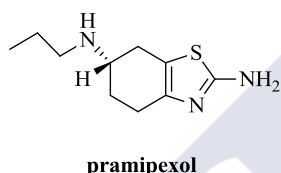
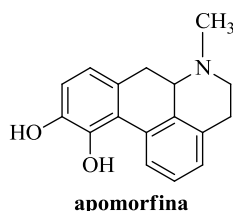
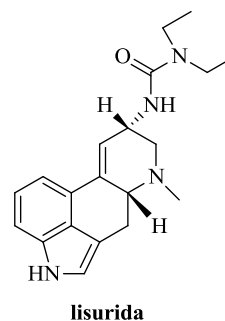
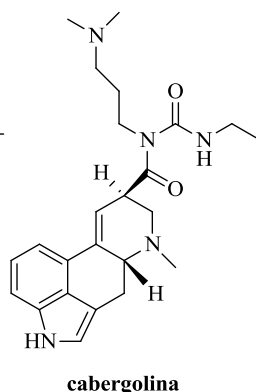
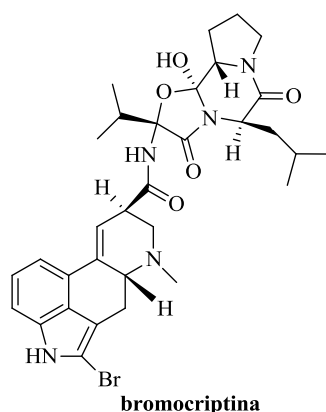
El uso de los agonistas dopaminérgicos en el tratamiento de la EP se inició con la **bromocriptina**, introducida en terapéutica por Donald Calne y col. en 1974. Inicialmente se emplearon como terapia complementaria, destinada a reducir los efectos motores adversos de la levodopa. Recientemente, ha ido aumentando su empleo en monoterapia, con el objetivo de postergar la iniciación del tratamiento con L-dopa, o en combinación con dosis bajas de la misma.³⁴ Los efectos beneficiosos de estos agonistas se basan en su capacidad de producir una estimulación directa y continua de los receptores dopaminérgicos pre y post-sinápticos.³⁵

Como hemos mencionado con anterioridad, estos agonistas se clasifican en derivados ergóticos como la bromocriptina, o la **cabergolina** y en no ergóticos como **lisurida**, **apomorfina**, **pramipexol**, **ropinirol** o **rotigotina**.³⁶

³⁴ Foley, P.; Gerlach, M.; Double, K. L.; Riederer, P. *J. Neural. Transm.* **2004**, *111*, 1375.

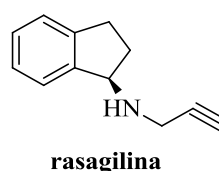
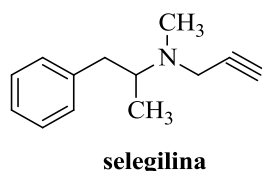
³⁵ Radad, K.; Gille, G.; Rausch, W.-D. *Pharmacol. Rep.* **2005**, *57*, 701.

³⁶ Brooks, D. J. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2000**, *68*, 685.



En la actualidad, se están realizando múltiples estudios sobre la relación existente entre el uso de agonistas ergóticos y la aparición de alteraciones cardíacas, aunque este hecho no está todavía claro, lo que ha generado serias discusiones sobre el empleo de estos compuestos. De hecho, un estudio realizado por Zanettini y col.³⁷ en el año 2007 concluye que existe un riesgo significativo de regurgitación valvular asociado al uso de agonistas ergóticos; sin embargo, de este estudio también se desprende que es aconsejable un seguimiento ecocardiográfico de los pacientes tratados con agonistas dopaminérgicos, tanto si son fármacos ergóticos, como no ergóticos.

Y por último, tenemos el grupo de fármacos perteneciente a la familia de los inhibidores de las enzimas encargadas de su catabolismo, como la *monoamino oxidasa B* (MAO-B). Dentro de estos inhibidores destacan la **selegilina**³⁸ y la **rasagilina**.³⁹



³⁷ Zanettini, R.; Antonini, A.; Gatto, E.; Gentile, R.; Tesei, S.; Pezzoli, G. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 39.

³⁸ (a) FDA Approves Emsam (Selegiline) as First Drug Patch for Depression. (b) Patkar, A. A.; Pae, C.; Masand, P. *S. CNS Spectr.* **2006**, 11, 363.

³⁹ Youdim, M. B. H.; Bakhle, Y. S. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, S287.

En el marco de la búsqueda de posibles soluciones a esta enfermedad, se han llevado a cabo una serie de estudios de actividad biológica con PLG, aislada por primera vez de tejido estriado bovino en 1971,^{40,41} que mostraron su actividad en trastornos del sistema nervioso central. Más tarde, se observó que la PLG ejerce un efecto modulador sobre el sistema dopaminérgico,⁴² incrementando la afinidad de ligandos agonistas sobre receptores dopaminérgicos de tipo D₂ (D_{2S} y D_{2L}) y D₄, aunque no presenta ninguna acción sobre los otros tipos de receptores (D₁, D₃ y D₅). También se ha propuesto que la PLG podría atenuar el efecto del análogo no hidrolizable de la guanosina trifosfato (GTP) denominado guanililimido difosfato (Gpp[NH]p) en cultivos celulares de neuroblastoma humano transfectado con ADN complementario (cADNs) del receptor D₂⁴³ y membranas de estriado bovino.⁴⁴ Además de estos resultados *in vitro*, este tripéptido ha mostrado ser eficaz como modulador de agonistas en ensayos *in vivo* en modelos de rata lesionada o modificada para que presente síntomas parkinsonianos o de discinesia.

1.2.2.3. Enfermedad de Alzheimer: etiología y tratamiento

Es actualmente la enfermedad neurodegenerativa más frecuente, con más de 8 millones de pacientes diagnosticados en el mundo, lo cual representa un grave problema desde el punto de vista social y económico. Se estima que en total existen 36 millones de enfermos de *Alzheimer*, de los cuales 28 millones todavía no han sido diagnosticados y por lo tanto no pueden acceder al tratamiento, ni a la información y los cuidados.

La EA, se caracteriza por el deterioro funcional y la pérdida progresiva de neuronas, traduciéndose en una disminución gradual de la memoria y de otras funciones cognitivas, lo que lleva a la demencia. Por lo general, el síntoma inicial de la enfermedad es la incapacidad de memorizar cosas nuevas; a medida que progresa, aparecen otros síntomas (confusión, irritabilidad mental y agresión, cambios de humor, trastornos del lenguaje, pérdida de la memoria antigua y una predisposición al aislamiento a medida que los síntomas del paciente se van acentuando). Gradualmente, se van perdiendo las funciones biológicas, lo que finalmente conduce a la muerte.

⁴⁰ Nair, R. M. G.; Kastin, A. J.; Schally, A. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 1376.

⁴¹ Durcker, G. E.; Ritzmann, R. F.; Wichlinski, L. J.; Engh, K.; Gordon, J. H.; Fields, J. Z. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, *47*, 141.

⁴² Plotnikoff, N. P.; Kastin, A. J.; Anderson, M. S.; Schally, A. V. *Life Sci.* **1971**, *10*, 1279.

⁴³ Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J. M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Fair, V. D.; Mishra, R. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1228.

⁴⁴ Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 960.

Anatómicamente, existen diferencias notables entre un cerebro normal y el de un paciente con EA (Figura 1). El volumen del cerebro se reduce por la muerte de células nerviosas, las hendiduras y surcos se hacen más notorios y las células que subsisten pierden la capacidad de reaccionar a los estímulos nerviosos. A día de hoy, las causas de la enfermedad todavía no han sido esclarecidas. Se han desarrollado tres hipótesis sobre la base de una serie de alteraciones biológicas observadas en los pacientes que sufren la enfermedad; así una de ellas se basa en el déficit de acetilcolina, otra en la acumulación de las proteínas β amiloide ($A\beta$) y/o tau, y la tercera en los trastornos metabólico.

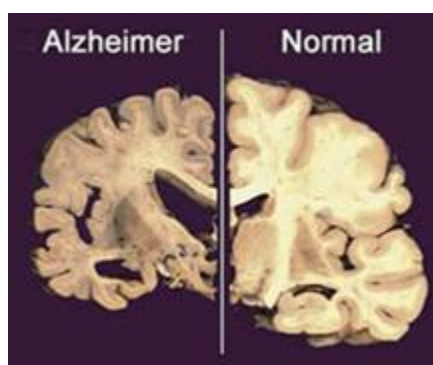
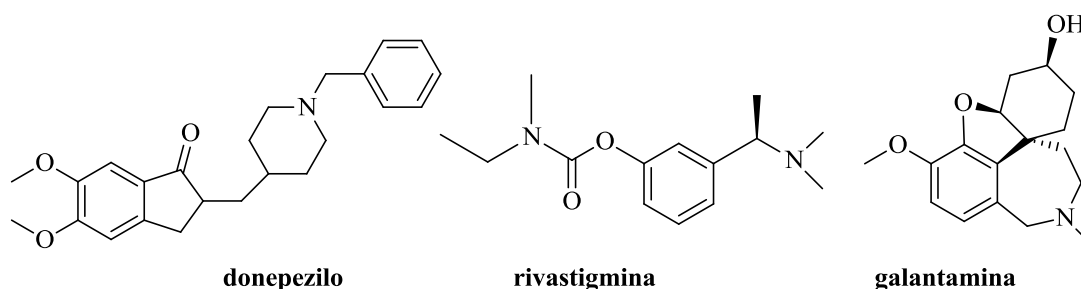


Figura 1. Diferencias anatómicas entre el cerebro de un paciente con Alzheimer y un individuo sano.

La **hipótesis colinérgica**, propuesta por primera vez por Davies and Maloney en 1976, fue la primera teoría planteada para tratar de explicar esta enfermedad, y desde entonces se han desarrollado fármacos anticolinérgicos que están sólo indicados para el tratamiento de la EA en un estadio de leve a moderado. Se basa en la observación de que en los cerebros de pacientes con EA se produce un déficit en la transmisión colinérgica central, a causa de la degeneración de los núcleos cerebrales basales anteriores, lo que constituye una significativa característica patológica y neuroquímica. Para mejorar la neurotransmisión colinérgica, se pueden utilizar fármacos que potencien la síntesis de acetilcolina, agonistas de receptores muscarínicos y nicotínicos o inhibidores de la *acetilcolinesterasa* (AChE).⁴⁵ En la práctica, este último grupo de fármacos constituye la primera línea de tratamiento en pacientes con EA de leve a moderada.⁴⁶

⁴⁵ Dumas, J. A.; Newhouse, P. A. *Pharmacol. Biochem. Be.* **2011**, 99, 254.

⁴⁶ Terry, A. V.; Buccafusco, J. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 306, 821.



Los más usados son el **donepezilo**,⁴⁷ la **rivastigmina**,⁴⁸ y la **galantamina**,⁴⁹ que aumentan la concentración y permanencia de la acetilcolina en la sinapsis neuronal. El tratamiento de la EA con inhibidores de la *acetilcolinesterasa* es solo paliativo o sintomático ya que estos fármacos no actúan sobre los mecanismos patogénicos de la enfermedad. El efecto terapéutico más común de estos fármacos es el retraso de la progresión de los síntomas clínicos respecto al deterioro previsto.

La **hipótesis amiloide** mantiene que la acumulación de la proteína A β es el evento patológico clave que conduce a la neurodegeneración en la EA. Una de las características que definen patológicamente la enfermedad de Alzheimer son las placas neuríticas o seniles y los ovillos neurofibrilares, cuyo principal componente es la sustancia β amiloide, constituida por subproductos metabólicos anormales, del tipo péptido β amiloide, derivados de la proteína precursora de A β (PPA β), proteína habitual de la membrana sintetizada por las propias neuronas. El componente predominante y que se deposita en primer lugar es el péptido amiloide insoluble A β 1–42 (A β 42), por ello según esta hipótesis, los depósitos de A β 42 serían el principal factor patogénico de la EA.

Por otro lado, el proceso patológico que conduce a la formación de ovillos neurofibrilares, con elevado contenido en proteína *tau* hiperfosforilada, comenzaría supuestamente por un desequilibrio entre la producción y el aclaramiento de A β . Sin embargo, la idea de que la enfermedad de Alzheimer se produce por la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares ha sido criticada por falta de pruebas.⁵⁰

Las terapias basadas en esta teoría se encuentran en fases avanzadas de desarrollo y los modelos sugieren que las terapias anti-A β pueden ser eficaces si se analizan como agentes para

⁴⁷ Bryson, H. M.; Benfield, P. *Drugs & Aging* **1997**, *10*, 240.

⁴⁸ Spencer, C. M.; Noble, S. *Drugs & Aging* **1998**, *13*, 391.

⁴⁹ Fulton, B.; Benfield, P. *Drugs & Aging* **1996**, *9*, 66.

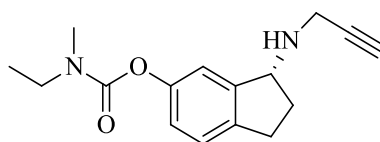
⁵⁰ Calleja-Puerta, S.; Hernández-Lahoz, C. *Alzheimer Real Invest. Demenc.* **2008**, *39*, 4.

prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo los resultados obtenidos en pacientes están demostrando que son menos eficaces de lo que se pensaba.⁵¹

La **hipótesis metabólica** se basa en el conocimiento de que la disminución en el metabolismo de glucosa precede a la aparición de la patología cerebral y el deterioro cognitivo en la EA, pero su causa inicial no se conoce. Estudios recientes han demostrado que la insulina no sólo regula el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en el cerebro, sino que también regula el desarrollo y la actividad neuronal, desempeñando un cometido relevante sobre los procesos de la memoria y del aprendizaje. Esto es lo que ha llevado a proponer que el deterioro de la señalización de la insulina en el cerebro, podría jugar un papel importante en el desarrollo de trastornos neurodegenerativos, ya que en estas circunstancias las neuronas se encuentran más expuestas a influencias tóxicas.

Esta teoría se ha visto apoyado por estudios recientes, que muestran una mejoría palpable en los procesos cognitivos y en la memoria de pacientes con EA tratados con insulina.⁵² Sin embargo, este tratamiento durante períodos largos de tiempo no es conveniente, ya que puede agravar la desensibilización de los receptores de insulina.⁵³

No se conoce por tanto cuales son las causa de la EA, se consideran diversas hipótesis y eventos bioquímicos para tratar de explicar que desencadena la EA, por lo tanto, el enfoque terapéutico actual, en el que los candidatos a fármacos están diseñados para que posean diversas propiedades farmacológicas y actúen sobre diversos eventos o dianas, ha estimulado el desarrollo de los fármacos de acción dual. Además, muchos estudios han sugerido que la inhibición de la MAO y de la AChE podría disminuir la deposición de β -amiloide, y por lo tanto inhibidores duales de estos dos enzimas podrían ser buenos candidatos a fármacos para el tratamiento de la EA. Como principal representante de este grupo de candidatos a fármacos tenemos el **ladostigilo**.



ladostigilo

⁵¹ Golde T. E.; Schneider, L. S.; Koo, E. H. *Neuron*. **2011**, 69, 203.

⁵² Liu, Y.; Liu, F.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Gong, C.-X. *J. Pathol.* **2011**, 225, 54.

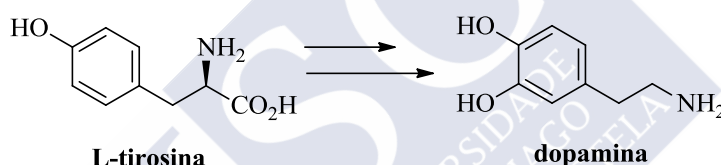
⁵³ Holscher, C. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, 39, 891.

1.3. DOPAMINA, CIRCUITOS Y RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

1.3.1. Antecedentes

En 1958 en el Laboratorio de Farmacología Química del Instituto Nacional del Corazón de Suecia, Arvid Carlsson y Nils-Åke Hillarp detectaron la presencia de dopamina en el cerebro y poco después Bertler y Rosengren percibieron una elevada concentración de la misma en el cuerpo estriado, en el que se encuentra una baja concentración de noradrenalina. Estos hechos llevaron a descartar la idea existente en esa época de que la dopamina era un simple precursor de otras catecolaminas.

La dopamina es uno de los neurotransmisores catecolaminérgicos más importantes del sistema nervioso central (SNC). Es un neurotransmisor versátil, que participa en la regulación de diversas funciones fisiológicas que van desde el control del movimiento hasta el desarrollo de conductas de base emocional.



La dopamina se biosintetiza en el organismo humano a partir del aminoácido L-tirosina, sobre el que actúan secuencialmente la *tirosina hidroxilasa* (TH) y la *L-DOPA descarboxilasa*, enzimas que también intervienen en la síntesis de la noradrenalina. La dopamina liberada se elimina del espacio sináptico por un proceso de difusión hacia regiones extrasinápticas, en las que se localiza un transportador específico de la familia de los transportadores de membrana dependientes de Na^+/Cl^- , que reintroduce la dopamina en la neurona.

A pesar de que las neuronas que utilizan dopamina como neurotransmisor son muy pocas, este sistema de neurotransmisión juega un importante papel en la regulación del movimiento, la conducta y la liberación de hormonas.

1.3.2. Circuitos dopaminérgicos

Vía nigroestriada: es la vía de control del movimiento. La dopamina se libera en unas neuronas originadas en una zona del cerebro denominada **sustancia nigra**, que a su vez están conectadas con el **cuerpo estriado**, que desempeña un papel importante en el control del sistema musculoesquelético.

Vía mesolímbica: es la segunda vía cerebral en la que interviene activamente la dopamina, las neuronas de la **región tegmental ventral** del cerebro transmiten DA a otras conectadas con diversas partes del sistema límbico, responsable a su vez de la regulación de las emociones, la motivación, la conducta, el sentido del olfato y diversas funciones autonómicas o involuntarias, como el latido cardíaco o la respiración.

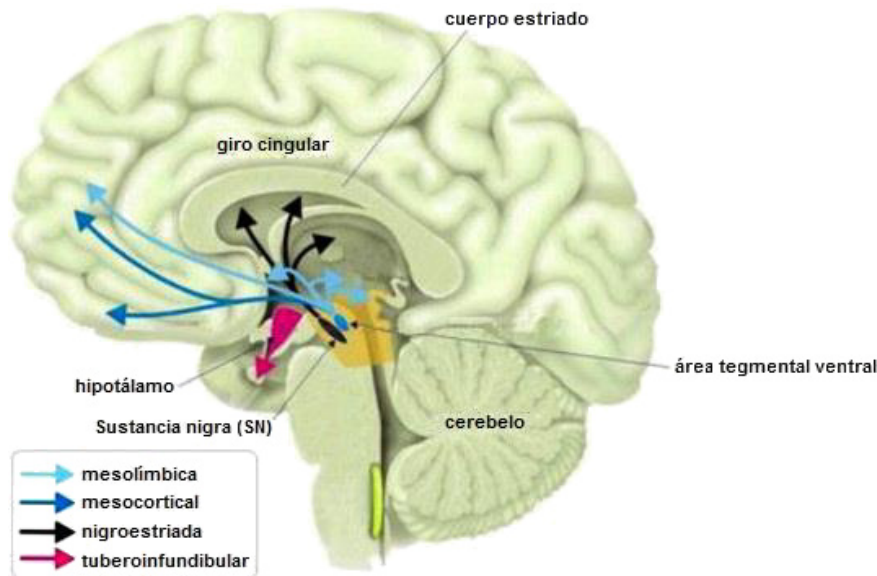


Figura 2. Circuitos dopaminérgicos.

Vía mesocortical: transmite dopamina desde la **región tegmental ventral** hacia el lóbulo frontal del córtex prefrontal, y está implicada en las respuestas emocionales cognitivas y la motivación.

Vía tuberoinfundibular: transmite dopamina desde el núcleo del hipocampo a la glándula pituitaria y regula la función neuroendocrinal, particularmente la liberación de prolactina, por lo que su mal funcionamiento estaría relacionado con un incremento de los niveles plasmáticos de prolactina que, consecuentemente, se refleja en la aparición de galactorrea, ginecomastia, infertilidad, entre otros síntomas.

1.3.3. Receptores de dopamina

1.3.3.1. Familias y estructura básica de receptores de dopamina

Los receptores se definen como moléculas o arreglos moleculares que pueden reconocer selectivamente a un ligando (agonista o antagonista) y ser activados por el ligando con eficacia intrínseca (agonista) para iniciar un evento celular.⁵⁴

Inicialmente los receptores de dopamina se clasificaron en dos subtipos D_1 y D_2 , según la capacidad estimulante o inhibitoria que ejercen sobre la *adenilatociclasa* (AC). Con la aparición de la tecnología recombinante de ADN y con ello la clonación molecular de receptores (1990), se puso de manifiesto una mayor heterogeneidad en los mismos, encontrándose diferencias farmacológicas, bioquímicas y fisiológicas entre ambas familias de receptores; así, los receptores D_1 (subgrupos D_1 y D_5) se asocian con funciones estimuladoras y los D_2 (D_{2L} , D_{2S} , D_3 y D_4) con funciones de tipo inhibitor. Los receptores D_1 son muy abundantes en el SNC y se localizan en todas las áreas del cerebro que reciben inervación dopaminérgica (cuerpo estriado, núcleo *accumbens* y corteza) y los receptores D_2 se localizan en neuronas que sintetizan dopamina (terminaciones dopaminérgicas del cuerpo estriado y del núcleo *accumbens*, cuerpo celular de estas neuronas en la sustancia nigra y en el área tegmental ventral).

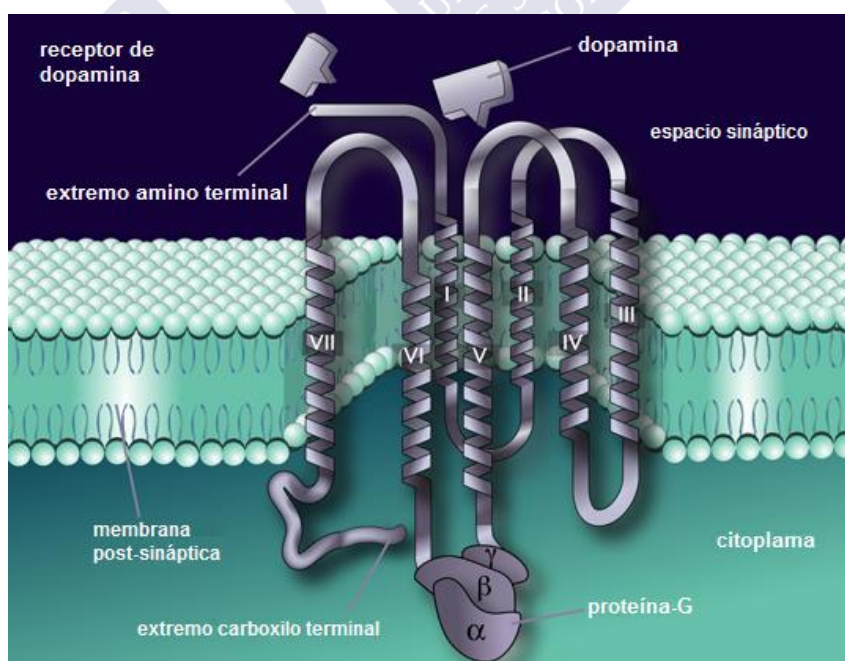


Figura 3. Representación esquemática de un receptor de dopamina acoplado a proteína G.

⁵⁴ Humphrey P. P. A. *Ann. New York Acad. Sci.* **1997**, 812, 1.

Todos los receptores dopaminérgicos poseen 7 dominios transmembranales (Figura 3), formados cada uno de ellos por entre 20 y 25 residuos hidrofóbicos, y están acoplados a sistemas de transducción intracelulares mediante proteínas G.⁵⁵ Los 7 dominios intramembranales están conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas y extracelulares y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado.

El tercer dominio citoplasmático exhibe diferencias entre los diferentes tipos de receptores, lo que parece ser la base de la interacción selectiva con un tipo o familia particular de proteínas G, que se traduce en las diferentes señales intracelulares. La última asa citoplasmática y la región carboxilo terminal (también intracelular) interaccionan con las proteínas G responsables de los efectos de la activación del receptor.⁵⁶

Los receptores D₁ y D₅ se caracterizan por tener esta asa corta y una región carboxilo terminal larga, y se acoplan a proteínas Gs.

Por el contrario, una estructura inversa (asa citoplasmática larga y un extremo carboxilo terminal corto) se observa en los receptores D₂, D₃ y D₄, que se acoplan a proteínas Gi.

Las proteínas G se denominan así por su interacción con nucleótidos de guanina (GTP/GDP) y se consideran esenciales para la transducción de las señales, ya que a través de ellas se estimula (Gs) o inhibe (Gi) la *adenilatociclase* o se estimula (Gq) la *fosfolipasa C*, regulándose así los niveles intracelulares de segundos mensajeros como el AMP cíclico o el fosfatidil inositol.

Cuando los receptores no están acoplados a proteínas G, muestran menor afinidad por los ligandos agonistas (*low affinity state*), mientras que aquellos receptores acoplados, es decir, funcionalmente activos, muestran mayor afinidad (*high affinity state*). Así, el estado de alta afinidad del receptor se corresponde con la formación del complejo ternario agonista-receptor-proteína G.

Las dos familias de receptores dopaminérgicos muestran diferencias importantes en sus características moleculares. Existiendo eso sí, una alta homología de secuencias entre los dos miembros de la familia D₁,^{57,58} como existe a su vez entre los miembros de la familia D₂. En

⁵⁵ Schwartz, J.-C.; Giros, B.; Martres, M.-P.; Sokoloff, P. *Curr. Trends Treat. Parkinson's Dis., Proc. Symp.* **1992**, 59.

⁵⁶ Dixon, R. A.; Sigal, I. S.; Rands, E.; Register, R. B.; Candelore, M. R.; Blake, A. D.; Strader, C. D. *Nature* **1987**, 326, 73.

⁵⁷ Zhou, Q. Z.; Grandy, D. K.; Thambi, L.; Kushner, J. A.; Van Tol, H. H. M.; Cone, R.; Pribnow, D.; Salon, J.; Bunzow, J. R.; Civelli, O. *Nature* **1990**, 347, 76.

⁵⁸ Sunahara, R. K.; Niznik, H. B.; Weiner, D. M.; Stormann, T. M.; Brann, M. R.; Kennedy, J. L.; Gelernter, J. E.; Rozmahel, R.; Yang, Y. L.; Israel, Y.; Seeman, P.; O'Dowd, B. F. *Nature* **1990**, 347, 80.

contraste, la homología entre subtipos de familias diferentes se corresponde con un 42–46%.^{59,60,61}

1.3.3.2. Receptores de la familia D₂

La familia de receptores D₂ está constituida por los tres subtipos denominados D₂, D₃ y D₄, que muestran como característica común una región intracelular, la i3 muy larga, de 101 a 166 aminoácidos, dependiendo del subtipo y de la especie. Sus implicaciones farmacológicas se han determinado mediante el empleo de agonistas selectivos, que reducen la bradicinesia, rigidez y temblores característicos de afecciones como la enfermedad de Parkinson, u otras menos frecuentes como el síndrome de piernas inquietas de Ekbom. Esta familia de receptores se relaciona entre otras, con funciones motoras, con propiedades neuroprotectoras⁶² y con la diferente respuesta observada en casos de abuso de drogas.⁶³

El receptor D₂ (Figura 4) existe en dos isoformas mayoritarias, denominadas receptores D₂ largos (D_{2L}, 444 aa) y receptores D₂ cortos (D_{2S}, 415 aa) formados a partir de un mismo gen por una inserción alternativa de aminoácidos,⁶⁴ que difieren en una cadena de 29 residuos aminoacídicos localizados en el tercer bucle citoplasmático.⁶⁵ Estas dos isoformas presentan el mismo patrón de expresión, aunque la proporción en que se encuentran depende de la región cerebral. Ambas isoformas presentan un perfil farmacológico similar, pero diferentes características funcionales, debido a que el tercer bucle intracelular desempeña un papel crucial en la transmisión de la señal, especialmente en la determinación de la especificidad del tipo de unión a proteína G, y por ello, en la activación de diferentes vías de señalización.⁶⁶

⁵⁹ Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G. *Physiol. Rev.* **1998**, 78, 189.

⁶⁰ Sawada, H.; Ibi, M.; Kihara, T.; Urushitani, M.; Akaike, A.; Kimura, J.; Shimohama, S. *Ann. Neurol.* **1998**, 44, 110.

⁶¹ O’Niell, M. J.; Hicks, C. A.; Ward, M. A.; Cardwell, G. P.; Reymann, J. M.; Allen, H.; Bentue-Ferrer, D. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 352, 37.

⁶² Iida, M.; Miyazaki, I.; Tanaka, K.; Kabuto, H.; Iwata-Ichikawa, E.; Ogawa, N. *Brain Res.* **1999**, 838, 51.

⁶³ Volkow, N. D.; Fowler, J. S.; Wang, G. P.; Swanson, J. M. *Mol. Psychiatry* **2004**, 9, 557.

⁶⁴ Montmayeur, J. P.; Bausero, P.; Amalaiky, N.; Maroteaux, I.; Hen, R.; Borrelli, E. *FEBS Lett.* **1991**, 278, 239.

⁶⁵ Vallone, D.; Picetti, R.; Borrelli, E. *Neurosci. Biobehav. R.* **2000**, 24, 125.

⁶⁶ Senogles, S. E.; Heimert, T. L.; Odife, E. R.; Quasney, M. W. *J. Biol. Chem.* **2004**, 24, 1601.

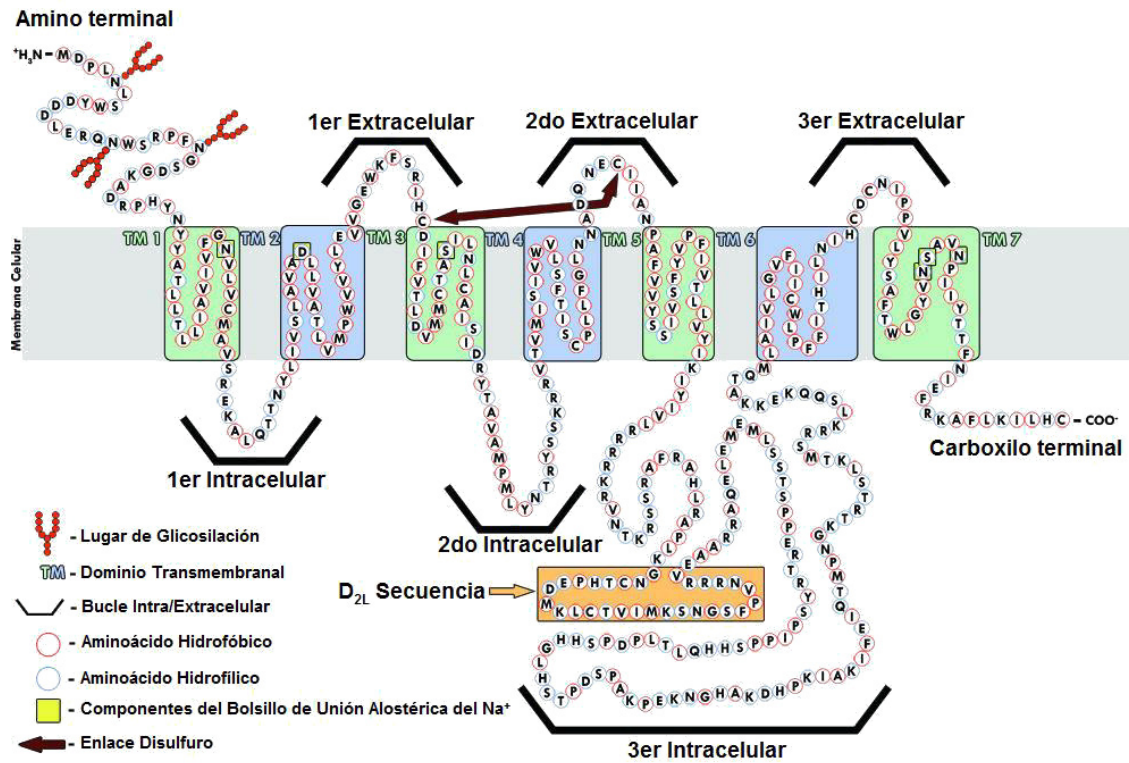


Figura 4. Secuencia y estructura del receptor D₂ de dopamina. Diagrama en cadena que muestra la composición de aminoácidos y características estructurales de los receptores de dopamina D_{2S} y D_{2L}, incluyendo diferencias de las secuencias y lugares de glicosilación.

1.4. PEQUEÑOS PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA

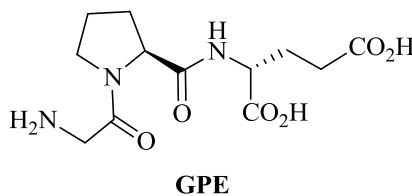
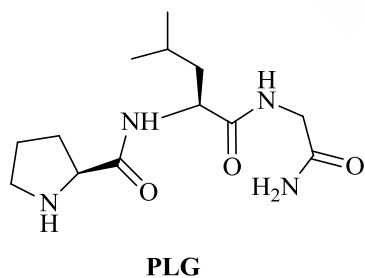
1.4.1. Aspectos generales

Numerosos estudios han mostrado el relevante papel desempeñado por pequeños péptidos en varios procesos fisiológicos, lo que los convierte en compuestos de gran interés como modelos para el desarrollo de fármacos.⁶⁷

En general el potencial terapéutico de los péptidos naturales es limitado debido sus propiedades fisicoquímicas. La inestabilidad de los enlaces amida frente a sistemas enzimáticos dificulta su administración por vía oral, además los péptidos son generalmente mal transportados a través de membranas celulares y son rápidamente excretados a través del hígado y riñones, y con frecuencia la flexibilidad de los pequeños péptidos trae como resultado una baja selectividad por los receptores. Por ello, estructuras peptídicas conformacionalmente más restringidas pueden proporcionar información de gran importancia sobre la conformación bioactiva de los péptidos.

Los péptidos endógenos actúan de forma muy selectiva como neurotransmisores, neuromoduladores, hormonas, inhibidores enzimáticos, etc., y una vez cumplida su función, son metabolizados por las proteasas, por lo que no se acumulan en el organismo ni ocasionan problemas de toxicidad.

Este es el caso de la **L-prolil-L-leucil-glicinamida (PLG)**, tripéptido hipotalámico también denominado **melanostatina** o factor de inhibición de liberación de la hormona estimulante de melanocito (MIF-1) y del tripéptido *N*-terminal del factor trófico IGF-1, **glicil-L-prolil-ácido L-glutámico (GPE)**, conocido también como **glipromato**.



⁶⁷ Hokfelt, T.; Broberger, C.; Xu, Z.-Q. D.; Sergeev, V.; Ubink, R.; Diez, M. *Neuropharmacology* **2000**, 39, 1337.

1.4.2. Estructura secundaria de los péptidos

Los péptidos poseen dos niveles estructurales: la denominada estructura primaria que representa la secuencia lineal de los aminoácidos que los forman, y la estructura secundaria que detalla la disposición espacial de los residuos que constituyen la cadena peptídica (Figura 5).

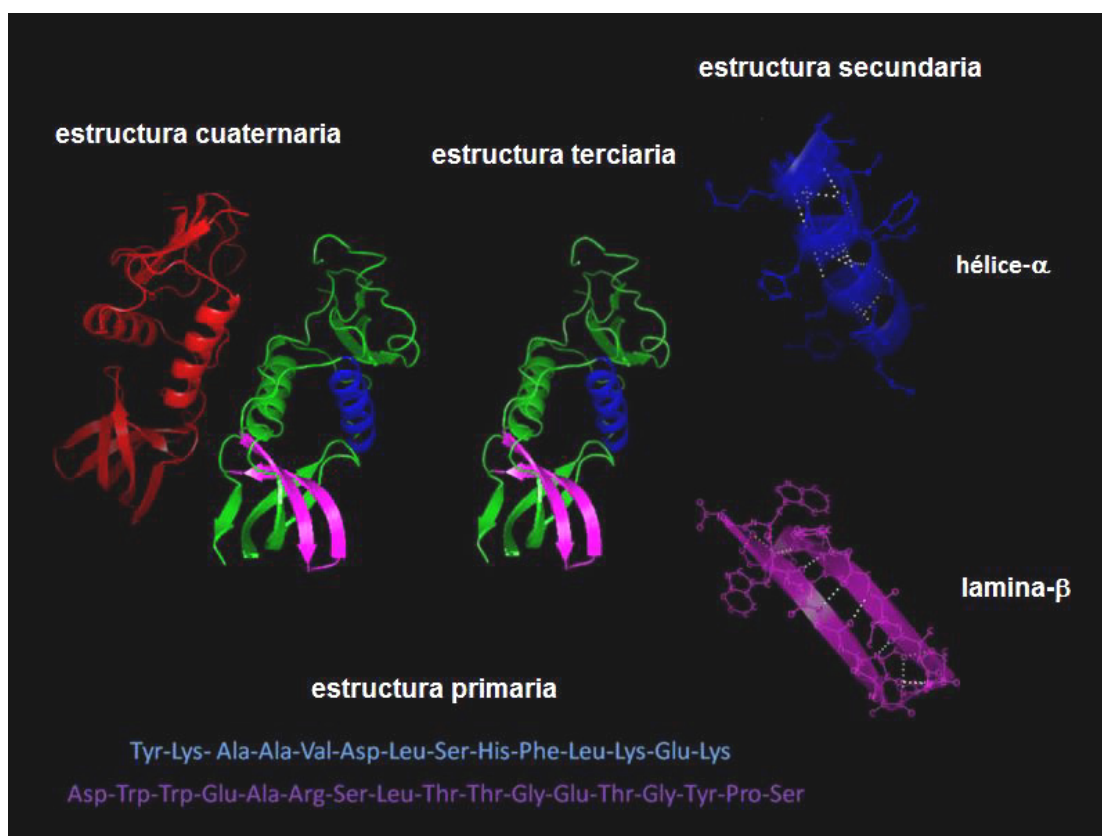


Figura 5. Representación básica de las estructuras de péptidos y proteínas.

Los residuos de los aminoácidos de la cadena peptídica pueden establecer entre sí enlaces de hidrógeno y/o interacciones no covalentes, dependiendo, en muchos casos, la actividad biológica de los péptidos de uno o varios segmentos de residuos de una estructura secundaria particular, pero el conjunto del péptido facilita la disposición espacial idónea para que dicho/os segmento/os interaccionen con el receptor.

Las cadenas peptídicas adoptan diversas estructuras secundarias, y la variación de parámetros tales como el número de aminoácidos consecutivos, los ángulos diedros, etc., son determinantes para definir una conformación.⁷ De manera general, se puede establecer una clasificación de este tipo de estructuras, basada en la disposición espacial de los residuos peptídicos:

⁷ Khan, M.; Eguchi, M. *Synthesis of Peptides Incorporating β -Turn Inducers and Mimetics*. En Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry, Murray, G.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C. Eds., **2003**, vol. E, 22c, p. 695.

Hélice- α : es un plegamiento periódico del esqueleto peptídico en forma de helicoides dextrógiro estabilizado por enlaces de hidrógeno entre los grupos NH del residuo (i) y el grupo carbonilo (C=O) del residuo ($i+4$).

Lamina β : es un ordenamiento en el que se establecen enlaces de hidrógeno entre los grupos amida y carbonilo de ramas enfrentadas, con los residuos laterales dispuestos en zig-zag a uno y otro lado del plano de las cadenas, formando laminas paralelas (en el mismo sentido) o antiparalelas (en sentido opuesto).

Giros: son secuencias de 3 a 5 residuos de aminoácidos, que inducen un cambio en la dirección de la cadena peptídica. Según el número de residuos que establezcan enlaces de hidrógeno, se pueden formar los denominados giros γ , giros β y, con menor frecuencia, giros α . Las conformaciones tipo giros β y γ son muy frecuentes en compuestos biológicamente activos, formados por pocos aminoácidos y siendo el giro β el más abundante en las proteínas naturales.

Los **giros γ** tienen lugar entre tres aminoácidos formando un pseudociclo de siete átomos; el enlace de hidrógeno se establece entre el carbonilo del primer aminoácido (i) y el grupo amida del último ($i+2$), (Figura 6).^{68,69} Existen dos tipos, denominados giro γ y giro γ inverso, que vienen definidos por los ángulos diedros del residuo ($i+1$).

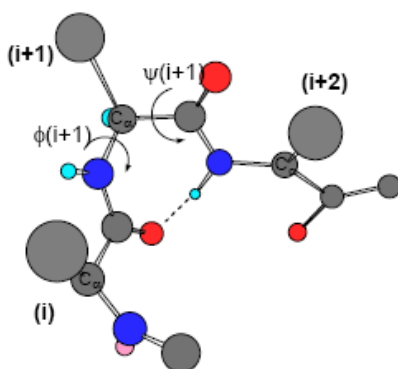


Figura 6. Representación de un giro γ .

Los **giros β** o conformación β -girada de los péptidos fueron definidos por primera vez en 1968 por Venkatachalam,⁷⁰ su formación es muy frecuente debido en gran parte a la estabilidad que provocan y además, son los mejor conocidos hasta el momento. Para su formación se requieren cuatro aminoácidos (i), ($i+1$), ($i+2$) e ($i+3$) ordenados desde el extremo N-terminal del residuo (i) hasta el extremo C-terminal del residuo ($i+3$), que forman un

⁶⁸ Chon, K. C. *Anal. Biochem.* **2000**, 286, 1.

⁶⁹ Rosenstroem, U.; Skoeld, C.; Plouffe, B.; Beandry, H.; Lindeberg, G.; Botros, M.; Nyberg, F.; Wolf, G.; Karlem, A.; Gallo-Payet, N.; Hallberg, A. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4009.

⁷⁰ Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, 6, 1425.

pseudociclo de 10 átomos, en el que el grupo amida del residuo $(i+3)$ actúa como dador en un enlace de hidrógeno al carbonilo del residuo (i) .⁷¹ La distancia entre los carbonos α de los residuos (i) e $(i+3)$ será menor de 7 Å,⁷² y los residuos $(i+1)$ e $(i+2)$ no describen una estructura helicoidal (Figura 7).

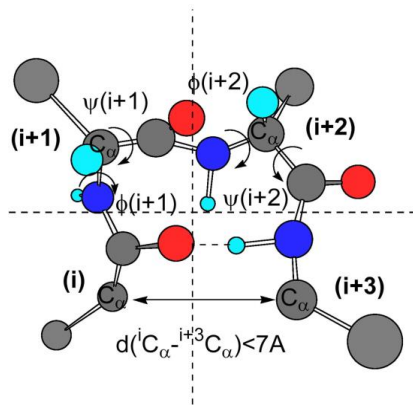


Figura 7. Representación de un giro β .

Un giro β puede adoptar diferentes conformaciones dependiendo de los valores de los ángulos diedros de $(i+1)$ e $(i+2)$, que además se presentarán con una abundancia variable.

La actividad biológica de un importante número de péptidos de bajo peso molecular, se asocia con las conformaciones de tipo β -giradas. Este es el caso de un centenar de ligandos reconocidos por receptores de membrana asociados a proteínas G (GPCRs).

1.4.3. PLG como modulador alostérico de receptores dopaminérgicos D_2 y su posible interés en el tratamiento de enfermedades que afectan al SNC

1.4.3.1. Interacción PLG-proteínas receptoras

La PLG, es un tripéptido hipotalámico endógeno, que además de ser un factor de inhibición de liberación de la hormona estimulante de melanocitos (MIF-1) por parte de la glándula pituitaria,⁷³ pronto se comprobó un potencial efecto sobre la L-DOPA⁷⁴ y una mejora temporal de los síntomas de la enfermedad de Parkinson.⁷⁵

⁷¹ Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. En *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C.B.; Edsall, J.T.; Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, 1985, 37, p. 1.

⁷² Kabsch, W.; Sander, C. *Biopolymers* **1983**, 22, 2577.

⁷³ Celis, M. E.; Thody, A. J.; Fisher, C. *Neurochem Int.* **1982**, 4, 27.

⁷⁴ Huidobro-Toro, J. P.; De Carolis, A. S.; Longo, V. G. *Pharmacol. Biochem. Be.* **1974**, 2, 105.

⁷⁵ Barbeau, A.; Roy, M.; Kastin, A. J. *Can. Med. Assoc. J.* **1976**, 114, 120.

Se ha encontrado que PLG interacciona con otros fármacos modificando sus efectos, así por ejemplo, antagoniza la catalepsia inducida por la morfina⁷⁶ y la disquinesia inducida por fármacos antipsicóticos,^{77,78,79,80,81} lo que hace esperar un muy interesante potencial terapéutico para este tripéptido. Sobre la base de estos resultados iniciales, otros estudios sobre PLG se han centrado en su en la búsqueda de su potencial actividad para aliviar las alteraciones de conducta provocadas por la enfermedad de Parkinson en modelos animales.^{82,83,84,85}

El mecanismo de acción farmacológico de PLG comenzó a intuirse al descubrirse su gran afinidad por el tejido estriado humano, así como su capacidad para reducir la sensibilidad inducida por el haloperidol sobre los receptores de dopamina del tejido estriado.⁸⁶ La posterior demostración de que PLG actúa como un modulador ortostérico positivo de los receptores D₂ de dopamina,⁴³ así como su capacidad de incrementar el efecto inhibitorio de los receptores D₂ de dopamina sobre la adenil ciclasa,⁸⁷ han ido esclareciendo algunos aspectos de su posible mecanismo de acción. Más recientemente PLG se ha demostrado capaz de acentuar la expresión de la proteína c-Fos en regiones dopaminérgicas,⁸⁸ aunque también puede reducir la expresión de c-Fos inducida por haloperidol;⁸⁹ esto esboza la posibilidad de que la modulación de receptores D₂ vía PLG, pueda provocar una funcionalización selectiva del receptor D₂ de dopamina a través de vías no clásicas, dependiendo del medio celular y del tono dopaminérgico.

1.4.3.2. PLG como ligando alostérico

Hoy en día es bien conocido que los GPCRs están implicados en multitud de trastornos debido a mutaciones o polimorfismos en su estructura; de ahí que sean un objetivo primordial para el desarrollo de fármacos. Sin embargo, es difícil encontrar ligandos selectivos (agonistas o antagonistas) de GPCRs, debido a la semejanza de los centros ortostéricos de los diferentes

⁷⁶ Chiu, S.; Mishra, R. K. *Eur. J. Pharmacol.* **1979**, *53*, 119.

⁷⁷ Chiu, S.; Paulose, C. S.; Mishra, R. K. *Science* **1981**, *214*, 1261.

⁷⁸ Bhargava, H. N. *Neuropharmacology* **1984**, *23*, 439.

⁷⁹ Chiu, P.; Rajakumar, G.; Chiu, S.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *Peptides* **1985**, *6*, 179.

⁸⁰ Mycroft, F. J.; Bhargava, H. N.; Wei, E. T. *Peptides* **1987**, *8*, 1051.

⁸¹ Sharma, S.; Paladino, P.; Gabriele, J.; Saeedi, H.; Henry, P.; Chang, M.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *Peptides* **2003**, *24*, 313.

⁸² Smith, J. R.; Morgan, M. *Gen. Pharmacol.* **1982**, *13*, 203.

⁸³ Mishra, R. K.; Marcotte, E. R.; Chugh, A.; Barlas, C.; Whan, D.; Johnson, R. L. *Peptides* **1997**, *18*, 1209.

⁸⁴ Sheng, J. G.; Xu, D. L.; Yu, H. Z.; Xu, X. R.; Tang, Q. M. *Life Sciences* **1987**, *40*, 2007.

⁸⁵ Marcotte, E. R.; Chugh, A.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *Peptides* **1998**, *19*, 403.

⁸⁶ Rajakumar, G.; Naas, F.; Johnson, R. L.; Chiu, S.; Yu, K. L.; Mishra, R. K. *Peptides* **1987**, *8*, 855.

⁴³ Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J. M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1228.

⁸⁷ Mishra, R. K.; Makman, M. H.; Costain, W. J.; Nair, V. D.; Johnson, R. L. *Neurosci. Lett.* **1999**, *269*, 21.

⁸⁸ Khan, R. S.; Yu, C.; Kastin, A. J.; He, Y.; Ehrensing, R. H.; Hsueh, H.; Stone, K. P.; Pan, W. *Int. J. Pept.* **2010**, ID 537639.

⁸⁹ Ott, M. C.; Costain, W. J.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *Peptides* **2000**, *21*, 301.

subtipos de receptores pertenecientes a una misma familia. Una posible solución a este problema es el empleo de moduladores de pequeño tamaño que actúen en otra zona del receptor que no sea el centro ortostérico, para provocar un efecto, ya sea activante o inhibitorio de la respuesta provocada por la unión agonista-receptor; este efecto se denomina alostérico.⁹⁰

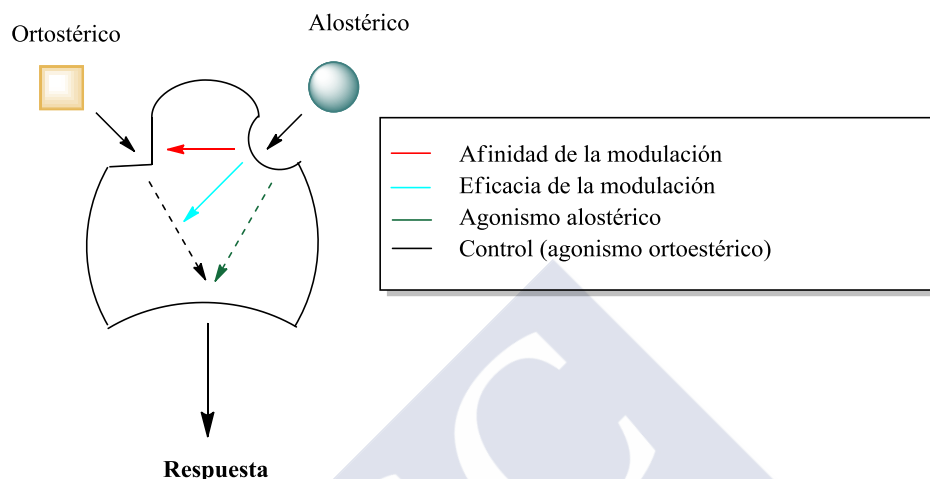


Figura 8. Representación esquemática de los modos de acción del efecto alostérico.

En general, los ligandos alostéricos pueden actuar siguiendo uno o la combinación de varios mecanismos de acción (Figura 8), la unión modulador-receptor altera la respuesta biológica debido a un cambio conformacional en el centro ortostérico, provocando:

- una mayor o menor afinidad del ligando endógeno, (flecha roja)
- o bien de las respuestas intracelulares (flecha azul)
- además, también es conocido que este tipo de moduladores exhiben un agonismo intrínseco, aún en ausencia de ligando ortostérico (flecha verde).

La PLG y algunos de sus peptidomiméticos aumentan la afinidad de los receptores D₂ por ligandos agonistas y, además, provocan un aumento de la proporción de receptores en estado de alta afinidad; el mecanismo modulador por el que se da la estabilización del estado de alta afinidad en el caso de PLG no ha sido definido hasta el momento, aunque se han propuesto dos posibles vías para explicar este hecho:

1. una interacción directa con un dominio del receptor diferente al lugar de unión del ligando agonista,

⁹⁰ Conn, P. J.; Christopoulos, A.; Lindsley, C. W. *Nature Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 41.

2.- un mecanismo indirecto asociado al incremento de la hidrólisis del GTP por parte de la proteína G,⁹¹ esta hipótesis parece menos probable, ya que el efecto modulador no se observa con otros receptores acoplados a proteínas Gi, como los adrenérgicos α_2 , ni con receptores acoplados a proteínas Gs, como los dopaminérgicos D₁,⁴³ sino que parece ser selectivo para los receptores dopaminérgicos D₂.

En cuanto a la conformación bioactiva que adopta PLG al unirse al receptor dopaminérgico, en la actualidad todavía no se conoce, aunque si se ha estudiado la conformación del péptido libre en disolución mediante técnicas de RMN en DMSO- d_6 ⁹² y de dicroísmo circular.⁹³ Además, estudios teóricos realizados en el mismo disolvente, indican que la conformación β -girada es una de las estructuras de menor contenido energético, lo que supone que el péptido presenta una alta flexibilidad.⁹⁴

También se conoce que en estado sólido (difracción de Rayos X⁹⁵ y laser Raman⁹⁶) la molécula presenta un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno carbonílico de la L-prolina y el protón amídico *trans* de la glicinamida.

Toda la información recavada en este ámbito indica que PLG, tanto en estado sólido como en disolución, adopta una conformación β -girada cuando se encuentra libre de interacciones con el receptor, además se ha descrito la existencia de un enlace de hidrógeno adicional entre el grupo amino de la L-prolina y el protón amídico de la L-leucina, lo que reduce el ángulo diédrico $\psi_{(i)}$ (Figura 9).

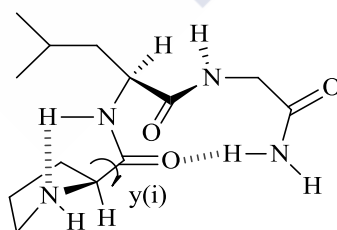


Figura 9. Conformación β -girada de PLG que incluye enlaces de hidrógeno intramoleculares.

Aunque estudios de relación estructura-actividad en miméticos de PLG donde los ángulos ϕ y ψ están constreñidos sugieren que la conformación bioactiva de PLG es de tipo II

- ⁹¹ Mishra, R. K.; Makman, M. H.; Costain, W. J.; Venugopalan, D. N.; Johnson, R. L. *Neurosci. Lett.* **1999**, 269, 21.
⁴³ Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J. M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Fair, V. D.; Mishra, R. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 3, 1228.
⁹² Higashijima, T.; Tasumi, M.; Miyazawa, T.; Miyoshi, M. *Eur. J. Biochem.* **1978**, 89, 543.
⁹³ Schwarz, R.; Mattice, W. L.; Spirtes, M. A. *Biopolymers* **1979**, 18, 1835.
⁹⁴ Zimmerman, S. S.; Baum, R.; Scheraga, H. A. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1982**, 19, 143.
⁹⁵ Reed, L. L.; Johnson, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7523.
⁹⁶ Hsue, T. H.; Chang, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 624, 340.

β -girada,⁹⁷ hasta el momento se desconoce la estructura detallada del receptor que interacciona con PLG y, por tanto, el mecanismo de acción que desencadena la respuesta.

Más recientemente, Strohmeier y col.⁹⁸ comparan valores teóricos y experimentales de tensores de desplazamientos químicos de ^{13}C and ^{15}N de la molécula de PLG, consiguiendo datos consistentes con los obtenidos por difracción de rayos X, confirmando la disposición de la columna vertebral de la molécula de melostatina y sus análogos. Posteriormente, Wood y col.⁹⁹ tratando de dilucidar los mecanismos por los cuales PLG y sus análogos modulan los receptores D_2 de dopamina, han desarrollado protocolos que permiten conseguir modelos computacionales, como valorar la densidad teórica funcional (DFT), la función de onda teórica (WFT) y cálculos de mecanismo molecular para PLG y otras pequeñas moléculas relacionadas con él mismo.

En un grupo de nuevos modelos de pseudopéptidos análogos de PLG, portadores de una estructura de β -lactama sustituyendo al aa central, el análisis conformacional en disoluciones en CDCl_3 y de DMSO-d_6 mediante técnicas de RMN mono y bidimensionales,¹⁰⁰ muestran que se establece un equilibrio entre las conformaciones giro-II β y giro- γ .

1.4.3.3. Análogos sintéticos de PLG

Los primeros peptidomiméticos de PLG incluían elementos de restricción en diferentes posiciones del tripéptido,¹⁰¹ estos análogos de PLG fueron sometidos a ensayos *in vitro* para estudiar su efecto sobre la afinidad del agonista de receptores dopaminérgicos D_2 , [^3H]-ADTN (2-amino-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno), comprobándose que las estructuras **1a** y **4** incrementaban la fijación del agonista a receptores D_2 de membranas de caudado bovino, siendo el de mayor efecto el compuesto **1a** (pirrolidinilcarbonilamino-2-oxopirrolidinacetamida, PAOPA) de configuración *R* en la posición α del anillo de γ -lactama.¹⁰²

⁹⁷ (a) Genin, M. J.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3481. (b) Khalil, E. M.; Ojala, W. H.; Pradhan, A.; Nair, V. D.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 628.

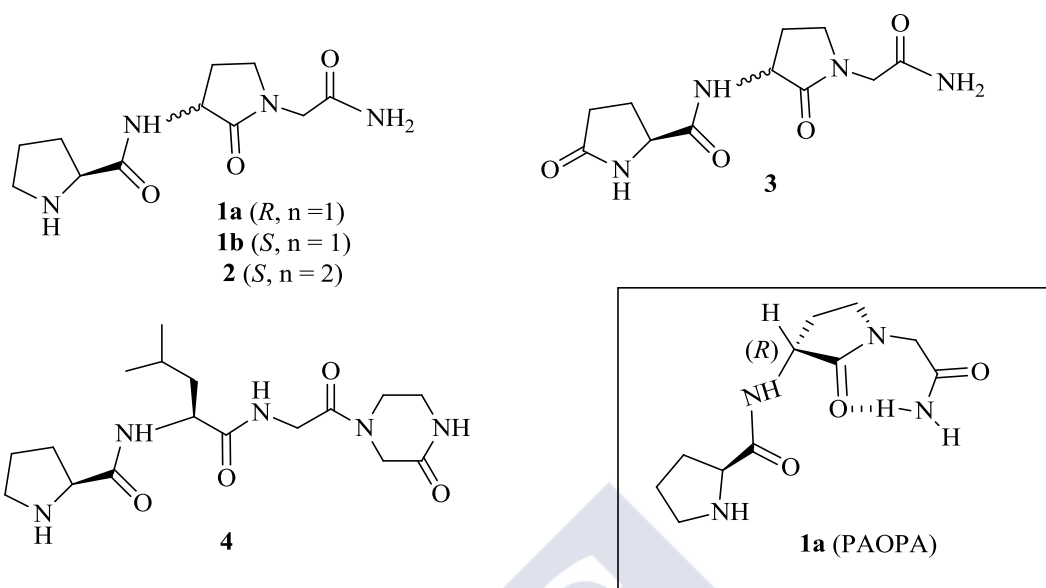
⁹⁸ Strohmeier, M.; Grant, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 966.

⁹⁹ Wood, R. L.; Young-Dixon, B. J.; Roy, A.; Gay, B. C.; Johnson, R. L.; Amin, E. A. *J. Mol. Struct.* **2010**, *944*, 76.

¹⁰⁰ (a) Tesis Doctoral de Natividad Jiménez. *Estudio de Pseudopéptidos β -Lactámicos Conformacionalmente Restringidos. Aplicación al Diseño de Análogos del Neuropeptido PLG*. Universidad del País Vasco UPV/EHU, **2009**. (b) Aizpurua, J. M.; Palomo, C.; Balentova, E.; Jimenez, A.; Andreie, E.; Sagartzazu-Aizpurua, M.; Miranda, J. I.; Linde, A. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 224.

¹⁰¹ Yu, K. L.; Rajakumar, G.; Srivastava, L. K.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1430.

¹⁰² Dolbeare, K.; Pontoriero, G. F.; Gupta, S. K.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 727.

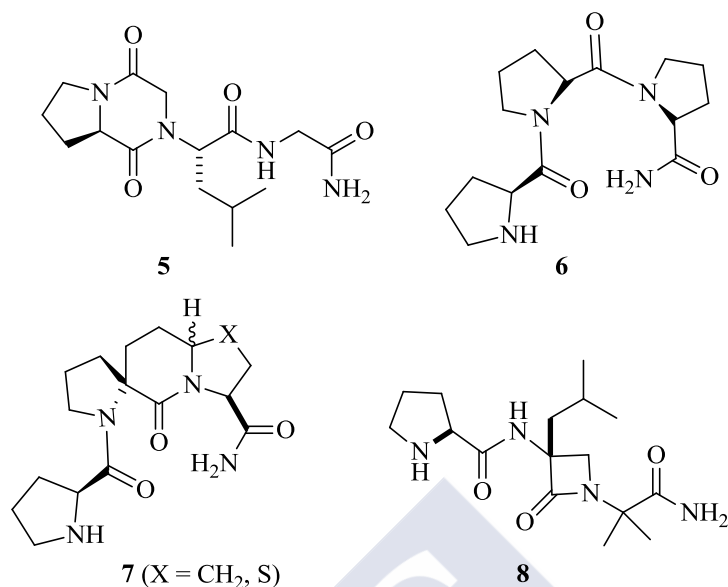


Tras estos primeros antecedentes, los mismos autores diseñaron varios análogos de PLG con otros elementos de restricción parcial,¹⁰³ ninguno de ellos mostró una actividad superior al PAOPA, siendo el mimético **5**, el que provoca un mayor incremento de afinidad del agonista *N*-propil-*nor*-apomorfina (NPA) por el receptor D₂. Los miméticos de PLG, **6** y **7** ($X = S$) que contienen en su esqueleto dos prolinas consecutivas y por tanto inductoras de una hélice II poliprolina (PPII),¹⁰⁴ también han mostrado un considerable efecto modulador sobre la afinidad del NPA por receptores D₂.¹⁰⁵ Esto parece indicar que la restricción conformacional necesaria para interactuar con el receptor no solamente puede ser ejercida por la posición central del pseudopéptido, sino que también modificaciones en los otros restos peptídicos pueden favorecer dicha interacción.

¹⁰³ Baures, P. W.; Ojala, W. H.; Costain, W. J.; Ott, M. C.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3594.

¹⁰⁴ (a) Crespo, L.; Sanclimens, G.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1756-1762. (b) Flemer, S.; Wurthmann, A.; Mamai, A.; Madalengoitia, J. S. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7593.

¹⁰⁵ Raghavan, B.; Skoblenick, K. J.; Bhagwanth, S.; Argintaru, N.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2043.



El pseudopéptido **8**^{100a} provoca un efecto modulador de la fijación del agonista NPA sobre receptores dopaminérgicos D₂ en membranas de caudado humano, diez veces superior al efecto observado en su ausencia.

Trabajos recientes indican que los moduladores alostéricos emergen como nuevas terapias para el tratamiento también de enfermedades psiquiátricas, como la esquizofrenia. En un estudio realizado con unos ciento cuarenta análogos de PLG, de nuevo el PAOPA resulta el más eficaz para prevenir los síntomas negativos de la esquizofrenia inducida por la anfetamina en ensayos en ratas.¹⁰⁶

^{100a} Tesis Doctoral de Natividad Jiménez. *Estudio de Pseudopéptidos β -Lactámicos Conformacionalmente Restringidos. Aplicación al Diseño de Análogos del Neuropeptido PLG*. Universidad del País Vasco UPV/EHU, **2009**.

¹⁰⁶ Beyaert, M. G.; Daya, R. P.; Dyck, B. A.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *Eur Neuropsychopharmacol.* **2013**, 23, 253.

1.4.4. GPE, tripéptido N-terminal del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y su posible utilidad en el tratamiento de procesos neurodegenerativos

1.4.4.1. Antecedentes

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) se encuentra ampliamente distribuido en el SNC de los mamíferos¹⁰⁷ y es un potente factor neurotrófico.¹⁰⁸ En los últimos quince años, el papel neuroprotector del IGF-1, ha sido objeto de intensos estudios en distintos tipos de agresiones experimentales relacionadas con procesos neurodegenerativos, habiéndose observado que estos procesos están asociados, entre otros factores, a cambios en los niveles de IGF-1.¹⁰⁹

El IGF-1, actúa como un factor de supervivencia en el cerebro, inhibiendo la *glicógeno sintasa quinasa 3 β* (GSK3 β) mediante la fosforilación de la Ser9 de una *fosfatidilinositol 3-quinasa* (PI3K)-dependiente, previniendo la apoptosis.¹¹⁰ Sin embargo su uso en el tratamiento de la EA se ve restringido por su dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica dado su elevado peso molecular, su naturaleza peptídica y sus efectos en el metabolismo, además se ha sugerido que aumenta el riesgo de tumorigénesis.

Por otro lado, hay muchas evidencias de que este péptido ejerce sus efectos a nivel central mediante dos mecanismos diferentes como consecuencia de su ruptura enzimática para dar lugar a dos fragmentos: el des-(1-3)-IGF-1 y el tripéptido N-terminal GPE (Figura 10), ambos con propiedades neuroprotectoras, sufriendo a su vez este último una ruptura a ciclo L-prolina-glicina (cPG).¹¹¹ El pequeño tamaño y la estabilidad de estos dos últimos péptidos en el SNC, los hacen buenos candidatos a ser empleados en clínica.

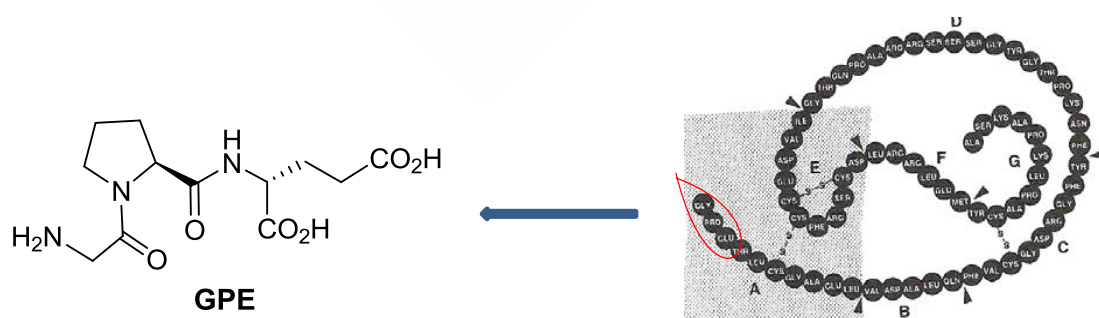


Figura 10. Ruptura enzimática de IGF-1 para dar lugar a GPE.

¹⁰⁷ Walsh, D. M., Selkoe, D. J. *Neuron*. **2004**, 44, 181.

¹⁰⁸ (a) Sara, V. R.; Carlsson-Skwirut, C. *Prog. Brain Res.* **1988**, 73, 87. (b) De Pablo, F.; De La Rosa, E. J. *Trends Neurosci.* **1995**, 18, 143.

¹⁰⁹ Anlar, B.; Sullivan, K. A.; Feldman, E. L. *Horm. Metab. Res.* **1999**, 31, 120.

¹¹⁰ (a) Doré, S.; Kar, S.; Quirion, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 4772. (b) Loddick, S. A.; Liu, X.-J.; Lu, Z.-X.; Liu, C.; Behan, D. P.; Chalmers, D. C.; Foster, A. C.; Vale, W. W.; Ling, N.; De Souza, E. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 1894.

¹¹¹ Busiguina, S.; Fernández, A. M.; Barrios, V.; Clark, R.; Tolbert, D. L.; Berciano, J.; Torres-Alemán, I. *Neurobiol. Dis.* **2000**, 657.

1.4.4.2. Utilidad terapéutica

El GPE presenta diversas acciones reguladoras en el cerebro, modula la liberación de ciertos neurotransmisores, así por ejemplo estimula la liberación de acetilcolina inducida por potasio en la corteza cerebral,¹¹² y de dopamina en el estriado.¹¹³ La administración exógena de GPE previene la muerte neuronal inducida por NMDA, ácido quinolínico, IH o 6-OHDA en diferentes regiones del cerebro,^{18,19,114,115} mostrándose capaz de prevenir la degeneración de los tres fenotipos principales de neuronas del estriado, las neuronas GABA-érgicas, las interneuronas colinérgicas y las interneuronas NADPHd, en un modelo animal de la enfermedad de Huntington.

Otros estudios en distintos modelos experimentales muestran que la administración de GPE ejerce efectos neuroprotectores después de procesos isquémicos, reduce la apoptosis e inhibe la proliferación microglial y es capaz de prevenir la pérdida de neuronas en un modelo animal después de un proceso de isquemia hipóxica.^{17,19,112,114,116}

Aunque se desconoce, hasta el momento, la presencia de un sistema enzimático específico de degradación metabólica de GPE, se sabe que este tripéptido tiene una vida media muy corta, degradándose rápidamente *in vivo* por acción de peptidasas, por lo que la inyección intravenosa continua parece ser la vía de administración más adecuada.¹⁷

En cuanto al mecanismo de acción a través del cual GPE ejerce sus efectos biológicos se ha sugerido que su fijación a células gliales podría conducir a la liberación de agentes neuroprotectores. Por otra parte, se sabe también que este péptido no se fija a los receptores de IGF-1, ni tampoco interacciona directamente con ellos, ni con los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) y kainato, ni con los mecanismos de recaptación de glutamato. Sin embargo, se ha demostrado que GPE es capaz de desplazar la unión de glutamato tritiado a membranas del cerebro anterior y a sinaptosomas hipotalámicos,^{19,117} hecho que sugiere una posible interacción con los receptores del ácido *N*-metil-D-aspartico o *N*-metil-D-aspartato (NMDA). En este sentido, se ha postulado que GPE

¹¹² Sara, V. R.; Carlsson-Skwirut, C.; Drakemberg, K.; Giacobini, M. B.; Haakansson, L.; Mirmiran, M.; Nordberg, A.; Olson, L.; Reinecke, M.; Stahlbom, P. A.; Nordqvist, A. C. S. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1993**, 692, 183.

¹¹³ Quevedo, C.; Alcazar, A.; Salinas, M. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 19192.

¹⁸ Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R.; Gluckman, P. *Brain Res.* **2000**, 859, 286.

¹⁹ Alexi, T.; Hughes, P. E.; Van Roon-Mom, W. M. C.; Faull, R. L. M.; Williams, C. E.; Clark, R. G.; Gluckman, P. D. *Exp. Neurol.* **1999**, 159, 84.

¹¹⁴ Saura, J.; Curatolo, L.; Williams, C. E.; Gatti, S.; Benatti, L.; Peeters, C.; Guan, J.; Dragunow, M.; Post, C.; Faull, R. L. M.; Gluckman, P. D.; Skinner, S. J. M. *NeuroReport* **1999**, 10, 161.

¹¹⁵ Guan, J.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Gluckman, P. D.; Williams, C. E. *Neuroscience* **1999**, 89, 649.

¹⁷ Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. S.; Williams, C. E.; Gluckman, P. D. *Brain Res.* **2001**, 922, 42.

¹¹⁶ Gorecki, D. C.; Beresewicz, M.; Zablocka, B. *Neurochem. Int.* **2007**, 51, 451.

¹¹⁷ Sara, V. R.; Carlsson-Skwirut, C.; Bergman, T.; Joernvall, H.; Roberts, P. J.; Crawford, M.; Haakansson, L. N.; Civalero, I.; Nordberg, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 165, 766.

puede actuar como antagonista de dichos receptores, no obstante, se desconoce hasta qué punto es capaz de unirse a las diferentes subunidades de los receptores NMDA, así como la posible existencia de otros receptores específicos para este péptido endógeno.

Un estudio reciente,¹¹⁸ indica que GPE ejerce *in vivo* un efecto neuroprotector sobre el sistema SRIF (factor de inhibición de la liberación de somatotropina) en el córtex temporal de ratas A β 25-35, este efecto independientemente de la destrucción de A β , puede antagonizar el efecto supresor de A β , mediante la activación de las proteínas kinasas B (AKt), que juegan un papel relevante en múltiples procesos celulares, tales como la apoptosis, proliferación celular, etc.

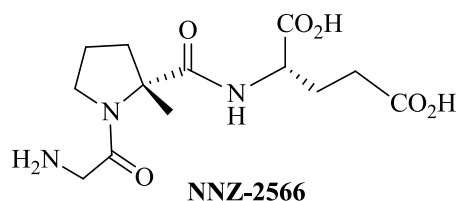
Precisamente, en relación con estos procesos, el GPE ha sido desarrollado bajo el nombre de **glipromato**, por Neuren Pharmaceuticals en Auckland (Nueva Zelanda), empresa que en un comunicado de diciembre de 2008 indicó la finalización de su ensayo clínico en fase III como neuroprotector en pacientes que pudiesen presentar problemas cognitivos derivados de cirugía cardíaca con reconstrucción de la arteria coronaria (cardiac by pass graft surgery, CABG) con o sin reemplazamiento y/o reparación de válvula. En el ensayo, se trató de comprobar la eficacia del glipromato en la reducción del decaimiento cognitivo, así como las diferencias funcionales observadas en la actividad de la vida diaria a partir de las 12–14 semanas de la intervención; en los 325 pacientes que completaron el estudio, no se encontraron diferencias destacables en los aspectos estudiados entre el grupo tratado con glipromato y el grupo tratado con un placebo.

1.4.4.3. Análogos de GPE de interés como neuroprotectores

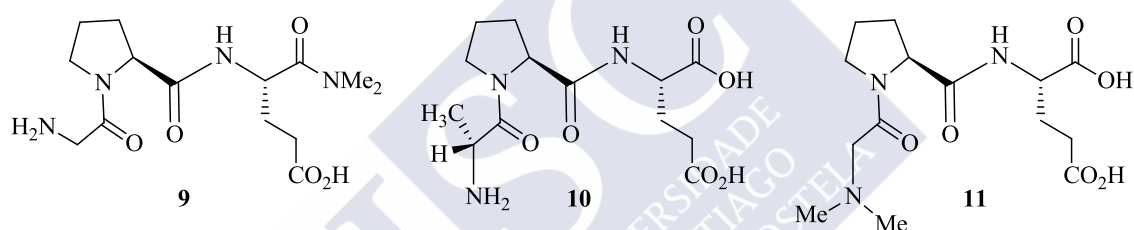
A pesar de los no demasiado alentadores resultados encontrados con el glipromato, Neuren Pharmaceuticals sigue centrando sus esfuerzos, en esta línea de investigación, en la búsqueda de nuevas moléculas, entre las que ha destacado el **NNZ-2566**, un análogo del glipromato, desarrollada en colaboración con la armada norteamericana. Este fármaco se encuentra actualmente en fase II de ensayo clínico para el tratamiento del daño cerebral traumático y sus consecuencias, siendo el neuroprotector que actualmente se presenta como más prometedor para el tratamiento de este tipo de dolencias.¹¹⁹

¹¹⁸ Burgos-Ramos, E.; Martos-Moreno, G. A.; López M. G.; Herranz, R.; Aguado-Llera, D.; Egea, J.; Frechilla, D.; Cenarruzabeitia, E.; León, R.; Arilla-Ferreiro, E.; Argente, J.; Barrios, V. *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 360.

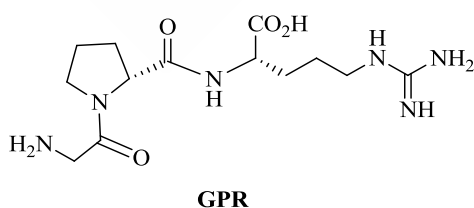
¹¹⁹ Lu, X-C. M. L.; Si, Y.; Williams, A. J.; Hartings, J. A.; Gryder, D.; Tortella, F. C. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* **2009**, *19*, 1924.



Otros análogos del GPE, en los que se introdujeron modificaciones en los restos de los otros aminoácidos han sido desarrollados por el grupo de Brimble y col.,^{120,121,122} entre los tripéptidos preparados, destacan los compuesto **9** (en el que el grupo ácido carboxílico en □ al grupo amino del ácido glutámico ha sido modificado),¹¹⁹ **10** y **11** (portadores de modificaciones sobre el resto la glicina),¹²¹ que presentan todos ellos una eficacia similar a GPE en cuanto a su efecto neuroprotector, expresado como el incremento de la supervivencia de células estriadas del SNC en estudios en ratas tras la inducción de daño isquémico cerebral.



También se ha demostrado que el **GRP** (glicil-L-prolil-L-arginina), otro análogo peptídico de GPE en el que el resto del ácido glutámico ha sido sustituido por arginina, previene la apoptosis neuronal inducida por β -amiloides¹²³ y por ello se presenta como un posible fármaco para el tratamiento del Alzheimer.



Otro estudio dirigido a introducir modificaciones sobre el residuo de prolina¹²⁴ parece indicar, que el plegamiento del anillo de pirrolidina juega un papel relevante en la respuesta

¹²⁰ Trotter, N. S.; Brimble, M. A.; Harris, P. W. R.; Callis, D. J.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 501.

¹²¹ Trotter, N. S.; Brimble, M. A.; Harris, P. W. R.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 519.

¹²² Lai, M. Y. H.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W. R.; Levi, M.S.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 533.

¹²⁰ Lu, X-C. M. L.; Si, Y.; Williams, A. J.; Hartings, J. A.; Gryder, D.; Tortella, F. C. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* **2009**, *19*, 1924

¹²³ Ioudina, M.; Uemura, E. *Exp. Neurol.* **2003**, *184*, 923.

¹²⁴ Alonso de Diego, S. A.; Muñoz, P.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; Martín-Martínez, M.; Cennarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Río, J.; Jimeno, M. L.; García-López, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *15*, 2279.

biológica de estos análogos del GPE, mientras que la preferencia *cis* o *trans* de los rotámeros alrededor del enlace peptídico glicil-L-prolina, no es transcendental para la actividad.

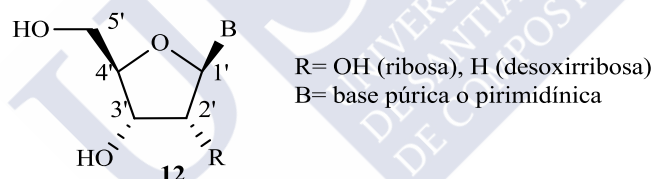


1.5. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS

1.5.1. Aspectos generales

Hace ya sesenta años, el descubrimiento de la estructura del ADN¹²⁵ revolucionó campos como la genética o la biología molecular aportando una mejor comprensión de los procesos bioquímicos por los que los ácidos nucleicos controlan la viabilidad celular *in vivo*, lo que condujo al diseño y desarrollo de fármacos que pudieran interferir con uno o más de los procesos controlados por dichas macromoléculas.

Los ácidos nucleicos (ADN y ARN), moléculas de las que dependen el almacenamiento de la información genética, su transmisión y la transcripción a síntesis proteica de todos los seres vivos, son polímeros formados por una o dos cadenas de monómeros llamados nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un azúcar (ribosa en el caso del ARN o 2-desoxirribosa en el ADN), una base nitrogenada, púrica o pirimidínica, y una molécula de ácido fosfórico. Los nucleósidos de ARN y ADN, obtenidos inicialmente a partir de productos naturales, son la unidad resultante de la unión mediante un enlace β -N-glicosídico de un azúcar y una base nitrogenada, sin ácido fosfórico, **12**.



En el campo de las terapias antitumoral¹²⁶ y antivírica,^{127,128} uno de los temas de investigación más activos lo constituye la introducción de pequeñas modificaciones sobre este tipo de moléculas, para aprovechar las diferencias enzimáticas existentes entre la célula normal y la célula maligna o entre la célula huésped y el virus, buscando una toxicidad selectiva hacia los segundos. Las modificaciones realizadas sobre la estructura de los compuestos naturales pueden afectar a la parte del azúcar (o pseudoazúcar), a la base púrica o pirimidínica, o bien a ambas partes, dando lugar a un gran número de compuestos denominados *análogos de nucleósidos*.

¹²⁵ Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, 171, 737.

¹²⁶ (a) MacCoss, M.; Robins, M. J. *Chemistry of Antitumour Agents*, Wilman., D. E. V. Ed., Blackie and Son, U.K., **1990**, p. 261. (b) Robins, R. K.; Kini, G. D., *Ibid*, p. 299.

¹²⁷ De Clercq, E. *Design of anti-AIDS Drugs*, Ed. Elsevier, Pharmacochimistry Library, **1990**, vol. 14.

¹²⁸ (a) Márquez, V. E.; Lim, M. *Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 1. (b) Robins, R. K.; Revankar, G. R. *Antiviral Drug Development*, De Clercq, E.; Walker, R. T. Eds., Plenum, New York, **1988**, p. 11. (c) Ichikawa, E.; Kato, K. *Current Med. Chem.* **2001**, 8, 381. (d) Márquez, V. E. *Adv. Antiviral Drug Des.* **1997**, 10, 674.

Se han descrito un amplio abanico de modificaciones estructurales, y algunas de ellas han llevado al desarrollo de fármacos de gran utilidad terapéutica, fundamentalmente dentro del campo de la terapia antiviral y anticancerígena. La mayor parte de ellos, presentan modificaciones en el azúcar del nucleósido, que van desde la apertura del anillo de tetrahydrofunano, (Figura 11), hasta sustituciones de diversa naturaleza en posiciones 2' y 3' del anillo del azúcar, muchas de las cuales se repiten en muchos de los antivirales desarrollados, como por ejemplo la carencia del grupo hidroxilo en posición 3'.

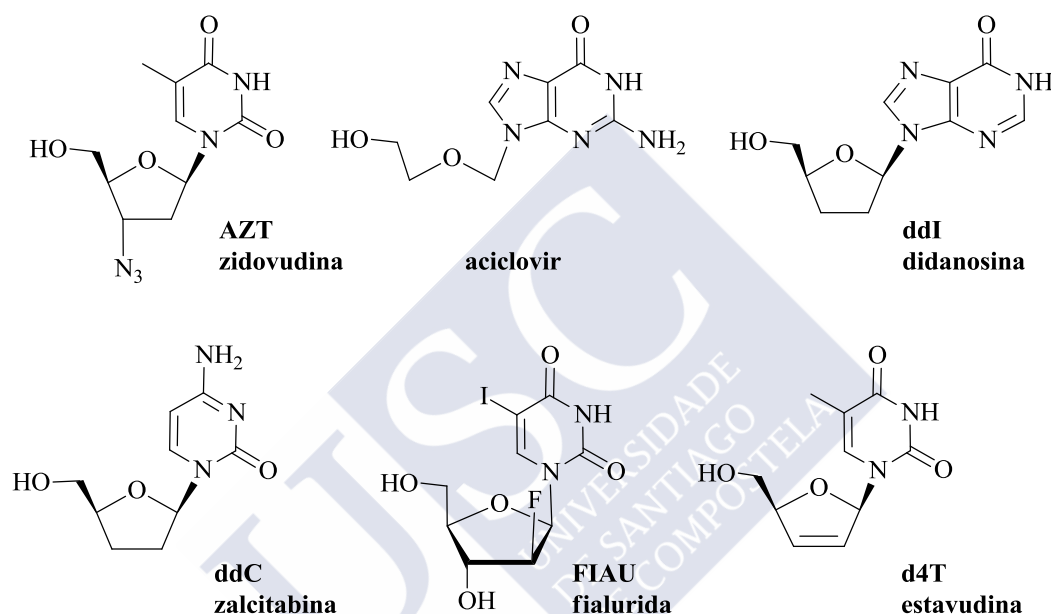


Figura 11

Una parte importante de los estudios realizados en este campo, se han dirigido al desarrollo de análogos de nucleósidos en los que el anillo de la furanosa ha sido remplazado por otros anillos de cinco e incluso cuatro miembros, ejemplos de esta nueva generación de fármacos son el **abacavir**,¹²⁹ **lobucavir**,¹³⁰ **troxacitabina**¹³¹ o **lamivudina**.¹³²

¹²⁹ Gaul, A.; Leeson, P. A.; Castaner, J. *Drug. Future* **1998**, 23, 1155.

¹³⁰ Ireland, C.; Leeson, P. A.; Castaner, J. *Drug. Future* **1997**, 22, 359.

¹³¹ (a) Groove, C. L.; Guo, X.; Liu, S.-H.; Gao, Z.; Chu, C. K.; Cheng, Y. C. *Cancer Res.* **1995**, 55, 3008. (b) Kim, H. O.; Schinazi, R. F.; Shanmuganathan, K.; Jeong, L. S.; Beach, J. W.; Nampalli, S.; Cannon, D. L.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 519.

¹³² (a) Beach, J. W.; Lak, S.; Alves, A. J.; Douglas, P.; Kim, H. O.; Chang, C. N.; Doong, S. L.; Schinazi, R. F.; Cheng, Y.-C.; Chu, C. K. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2217. (b) Jeong, L. S.; Schinazi, R. F.; Beach, J. W.; Kim, H. O.; Nampalli, S.; Shanmuganathan, K.; Alves, A. J.; McMillan, A.; Chu, C. K.; Mahis, R. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 181. (c) Coates, J. A. V.; Cammack, N.; Jenkinson, H. J.; Jowett, A. J.; Jowett, M. I.; Pearson, B. A.; Rouse, P. L.; Viner, K. C.; Cameron, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36, 733.

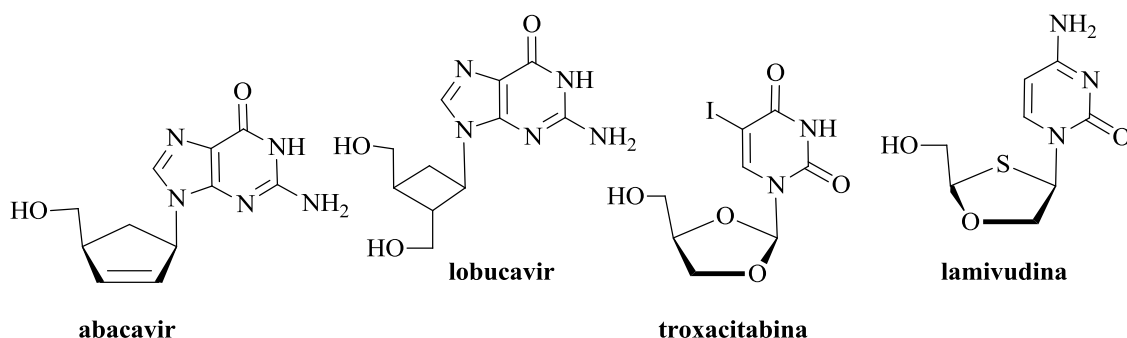


Figura 12

De manera general desde el punto de vista de su estructura química, los análogos de nucleósidos se pueden clasificar en tres grandes grupos. El primero de ellos constituido por los **nucleósidos convencionales** (D-nucleósidos con modificaciones menores en el azúcar y/o la base heterocíclica respecto a los nucleósidos naturales) y sus **nucleósidos reversos** (enantiómeros de los nucleósidos normales);¹³³ el segundo incluye a aquellos nucleósidos en los que el resto del azúcar está sustituido por un carbociclo, constituyendo el grupo de los **nucleósidos carbocíclicos** o **carbanucleósidos**,¹³⁴ y el tercero incluye análogos nucleosídicos en el que el resto del azúcar está sustituido por un sistema heterocíclico diferente del tetrahydrofurano, denominados **nucleósidos heterocíclicos** por analogía con los anteriores. Entre las diversas posibilidades de nucleósidos heterocíclicos se incluyen análogos de nucleósidos en los que el átomo de oxígeno de la furanosa es remplazado por diferentes heteroátomos, como los tianucleósidos, fosfonucleósidos y azanucleósidos, admitiéndose también análogos que presentan un segundo heteroátomo en el sistema del pseudoazúcar como los oxazolidinil,¹³⁵ tiazolidinil¹³⁶ e isoxazolidinil¹³⁷ análogos, o análogos en que en el heteroátomo se dispone en una posición diferente a la 1' de los nucleósidos.

¹³³ Bolon, P. J.; Wang, P. Y.; Chu, C. K.; Gosselin, G.; Boudou, V.; Pierra, C.; Mathe, C.; Imbach, J.-L.; Farai, A.; Alaoui, M. A.; Sommadossi, J.-P.; Pai, S. B.; Zhu, Y.-L.; Lin, J.-S.; Cheng, Y.-C.; Schinazi, R.F. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1657.

¹³⁴ (a) Merino, P. *Curr. Med. Chem. AIA* **2002**, 1, 389. (b) Merino, P. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 539.

¹³⁵ Du, J.; Chu, C. K. *Nucleos. Nucleot.* **1998**, 17, 1.

¹³⁶ Faury, P.; Camplo, M.; Mourier, N.; Trabaud, C.; Niddam, V.; Kraus, J.-L. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1996**, 133, 553.

¹³⁷ (a) Chiacchio, Ugo; Balestrieri, E.; Macchi, B.; Iannazzo, D.; Piperno, A.; Rescifina, A.; Romeo, R.; Saglimbeni, M.; Sciortino, M. T.; Valveri, V.; Mastino, A.; Romeo, G. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1389. (b) Chiacchio, U.; Balestrieri, E. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 9322. (c) Romeo, G.; Iannazzo, D.; Piperno, A.; Romeo, R.; Saglimbeni, M.; Chiacchio, M. A.; Balestrieri, E.; Macchi, B.; Mastino, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3818.

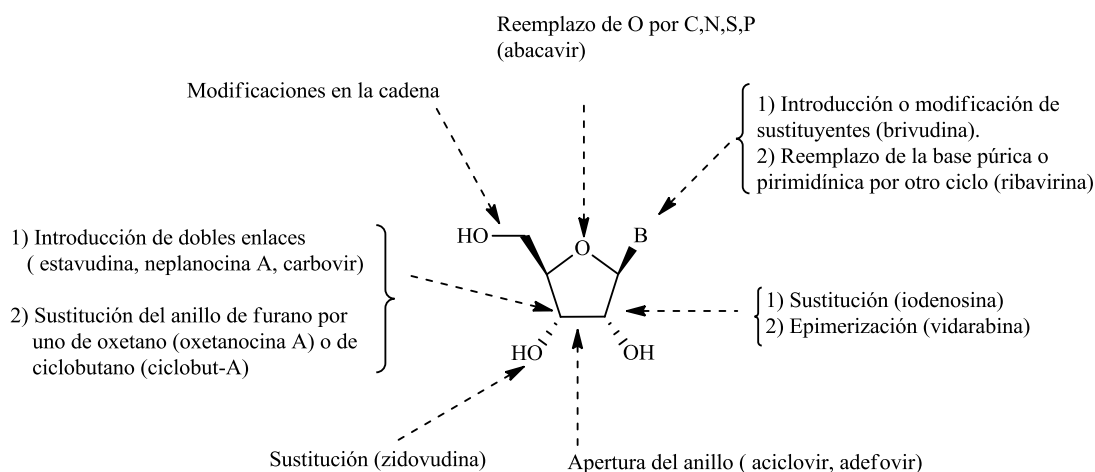


Figura 13

A su vez dentro de estos grupos nos encontramos que, a las modificaciones anteriormente citadas sobre la estructura de los nucleósidos naturales, se suman en muchos casos otras variaciones, así por ejemplo los denominados de forma genérica como C-nucleósidos (con enlace entre el carbono anomérico del azúcar y un carbono de la base), nucleósidos modificados en la base heterocíclica (denominados también como nucleósidos portadores de “bases atípicas”), homonucleósidos (en los que la distancia entre la base heterocíclica y el grupo hidroxilo de la posición 5' se encuentra aumentada o disminuida en un grupo metileno), etc.

Las modificaciones en la parte de la base heterocíclica determinan la eficacia de la interacción entre las bases, mientras que las modificaciones en el azúcar determinan la capacidad de propagación de la cadena de ácido nucleico mediante la formación de enlaces fosfodiéster. La eficacia de los análogos nucleosídicos depende de su conversión a la forma trifosfatada activa vía kinasas celulares, que posteriormente tiene que ser aceptado por las enzimas para después incorporarse a la cadena de nucleótidos.

Los análogos de nucleósidos, de estructura similar a la de los nucleósidos naturales, se incorporan a las cadenas de ADN o de ARN en formación y según su actividad se pueden dividir en dos categorías:

- 1) si el análogo presenta una modificación en la parte del azúcar, como la falta del grupo 2-hidroxilo, 3-hidroxilo o ambos, se impide la formación del enlace fosfodiéster en la cadena y por lo tanto se produce la terminación de la misma;

2) si la estructura del análogo permite completar la biosíntesis del ácido nucleico, éste dará lugar a la formación de proteínas defectuosas o enzimas no funcionales con la consecuente inhibición de la replicación viral.

En el grupo de análogos de nucleósidos nos encontramos fármacos con diferentes actividades entre las que destacan la antibiótica, cuando el ser vivo al que afectan es una célula o un microbio patógeno, o como previamente hemos comentado la anticancerígena y la antiviral.

1.5.2. Análogos de nucleósidos portadores de bases atípicas en el tratamiento de la hepatitis C y como inmunosupresores

El virus de la hepatitis C (VHC) es un patógeno común que infecta aproximadamente a 180 millones de personas en todo el mundo y que ya es la causa más común de trasplante de hígado. Se trata de un virus de ARN de cadena sencilla de la familia *Flaviridae*¹³⁸ que se identificó en 1989 de forma no ambigua como el principal agente responsable de la hepatitis no-A y no-B.¹³⁹ La infección por VHC puede permanecer asintomática o bien causar síntomas, lo que ocurre en el 60–80% de las personas infectadas, éstos en la mayoría de los casos son benignos, de manera que los pacientes pueden no saber que están afectados por el virus hasta de una a tres décadas después de haberlo contraído,¹⁴⁰ cuando el daño hepático crónico se manifiesta en forma de cirrosis o carcinoma hepatocelular.

En la población infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a partir de la introducción de terapias antirretrovirales altamente eficaces y de la consecuente reducción de morbilidad y mortalidad, la hepatitis C se está transformando en una de las patologías crónicas más prevalentes. En Europa y Estados Unidos, aproximadamente el 30% de los pacientes seropositivos para VIH están también afectados por el VHC.

En la actualidad no existe ninguna vacuna o terapia totalmente efectiva contra todos los genotipos del VHC, aunque la clonación del VHC en 1989 ha sido muy útil para caracterizar el virus e identificar objetivos potenciales para el desarrollo de fármacos. Los nuevos agentes antivirales incluyen inhibidores de las enzimas replicativas tales como proteasas, helicasas y polimerasas del VHC y aproximaciones genéticas como ribozimas y oligonucleótidos antisentido.¹⁴¹ De todas maneras, aunque la cantidad de nuevas infecciones está disminuyendo,

¹³⁸ Lauer, G. M.; Walker, B. D. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 41.

¹³⁹ Choo, Q. L.; Kuo, G.; Weiner, A. J.; Overby, L. R.; Bradley, D. W.; Houghton, M. *Science* **1989**, *244*, 359.

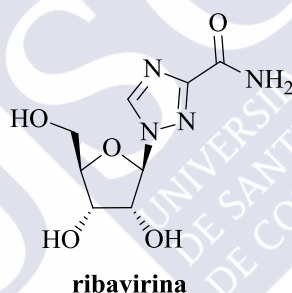
¹⁴⁰ Hoofnagle, J. H. *Hepatology* **1997**, *26*, 15S.

¹⁴¹ Gordon, C. P.; Keller, P. A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1.

se espera un aumento de la mortalidad en Europa y Estados Unidos hasta el año 2015,¹⁴² lo que hace necesario un tratamiento más eficaz y seguro de la infección.¹⁴³

A pesar del éxito de los análogos nucleosídicos en la terapia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), sólo unos pocos son activos contra la polimerasa del VHC. Actualmente, el único análogo nucleosídico terapéuticamente útil contra el VHC es la **ribavirina** (virazole[®]), portador de una base no natural. Fue el primer nucleósido sintético que exhibió actividad antiviral de amplio espectro;¹⁴⁴ sintetizado por primera vez por Sidwell y col. en 1972.¹⁴⁵

La ribavirina además de emplearse en clínica contra el VHC y el virus del herpes, se usa también en el tratamiento del sarampión o de las paperas y en aerosol se utiliza como monoterapia en el tratamiento de la infección pediátrica por virus sincitial respiratorio.¹⁴⁶ A nivel experimentalmente se ha usado frente a otras infecciones víricas, como la fiebre de Lassa¹⁴⁷ y otras fiebres hemorrágicas víricas.¹⁴⁸



Su amplio espectro puede atribuirse potencialmente a sus múltiples mecanismos de acción, actuando sobre diferentes fases del ciclo vital de los virus. La cristalografía de rayos X indicó que el grupo carboxamida hace que la ribavirina se asemeje a la guanosina y, como análogo púrico, puede intervenir en múltiples procesos celulares y víricos. Además de la ribavirina, otro agente empleado para el tratamiento de la hepatitis C es el interferón- α pegilado (PEG-IFN- α),¹⁴⁹ una citoquina con actividad antivírica e inmunomoduladora¹⁵⁰ cuya función consiste en proteger de la infección vírica a las células no infectadas. Desafortunadamente, la

¹⁴² Pol, S.; Mallet, V. O. *Expert Opin. Biolog. Ther.* **2006**, *6*, 923.

¹⁴³ Hayashi, N.; Takehara, T. *J. Gastroenterol.* **2006**, *41*, 17.

¹⁴⁴ Manns, M. P.; McHutchinson, J. G.; Gordon, S. C.; Rustgi, V. K.; Shiffman, M.; Reindollar, R.; Goodman, Z. D.; Koury, K.; Ling, M. H.; Albrecht, J. K. *Lancet* **2001**, *358*, 958.

¹⁴⁵ Witkowski, J. T.; Robins, R. K.; Sidwell, R. W.; Simon, L. N. *J. Med. Chem.* **1972**, *11*, 1150.

¹⁴⁶ Cooper, A. C.; Banasiak, N. C.; Allen, P. J. *Pediatr. Nur.* **2003**, *6*, 452.

¹⁴⁷ McCormick, J. B.; King, I. J.; Webb, P. A.; Scribner, C. L.; Craven, R. B.; Johnson, K. M.; Elliott, L. H.; Belmont-Williams, R. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *1*, 20.

¹⁴⁸ Bronze, M. S.; Greenfield, R. A. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *2*, 172.

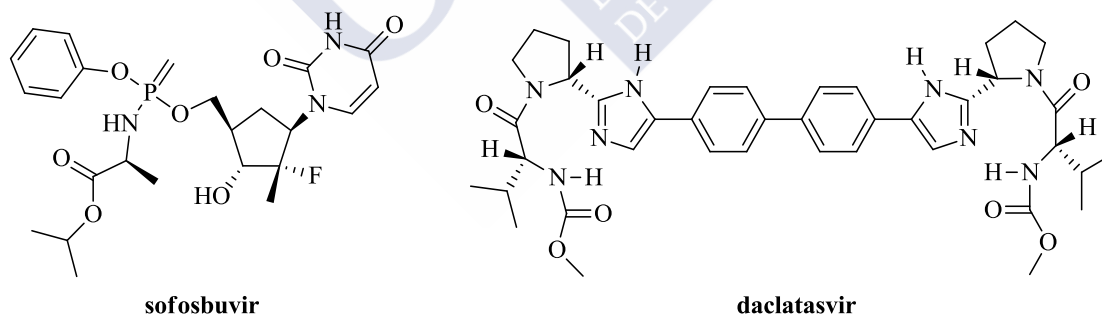
¹⁴⁹ Davis, G. L.; Wong, J. B.; McHutchinson, J. G.; Manns, M. P.; Harvey, J.; Albrecht, J. *Hepatology* **2003**, *38*, 645.

¹⁵⁰ Moussalli, J.; Opolon, P.; Poynard, T. *Hepatitis* **1998**, *5*, 73.

terapia combinada de IFN- α y ribavirina resulta efectiva en menos del 41% de los pacientes tratados.¹⁵¹

En el año 2012 la FDA ha aprobado el empleo de dos inhibidores de la proteasa NS3/4a del genotipo 1 del VHC, boceprevir y telaprevir. Combinando uno de ellos con el tratamiento clásico, se ha aumentado la tasa de respuesta viral sostenida (RVS) o carga vírica indetectable seis meses después del fin del tratamiento de menos del 50% a más del 70%, tanto en pacientes no tratados previamente como en pacientes que no han respondido al tratamiento previo. Además, con esta terapia triple se ha logrado el acortamiento de las pautas de tratamiento a unas 24 semanas, sin afectar las tasas de respuesta viral sostenida (RVS).¹⁵²

En la actualidad la compañía Gilead Sciences ha solicitado, con fecha 10 de abril de 2013, a la FDA autorización para la comercialización de un nuevo fármaco para el tratamiento de la hepatitis C: **sofosbuvir** (GS-7977).¹⁵³ Es un profármaco de estructura nucleotídica que en el organismo se metaboliza a 2'-deoxi-2'- α -fluoro- β -C-metiluridina-5-monofosfato y que inhibe la polimerasa del virus de la hepatitis C.¹⁵⁴ Sofosbuvir ha mostrado una excelente eficacia clínica cuando se usa conjuntamente con la combinación de ribavirina e interferón pegilado o simplemente combinado con interferón libre. Además su asociación con inhibidores de NS5A, como por ejemplo **daclatasvir**, ha conseguido alcanzar niveles de respuesta viral próxima al 100%.



A pesar de estos progresos existe una necesidad urgente de desarrollar terapias más efectivas y tolerables contra la hepatitis C crónica. En esta línea en los últimos años han cobrado una relevancia cada vez mayor los estudios sobre análogos nucleosídicos portadores de bases no naturales o “atípicas”, mereciendo especial atención los nucleósidos portadores de anillos heterocíclicos de cinco miembros, como imidazoles o triazoles; en este grupo se incluyen

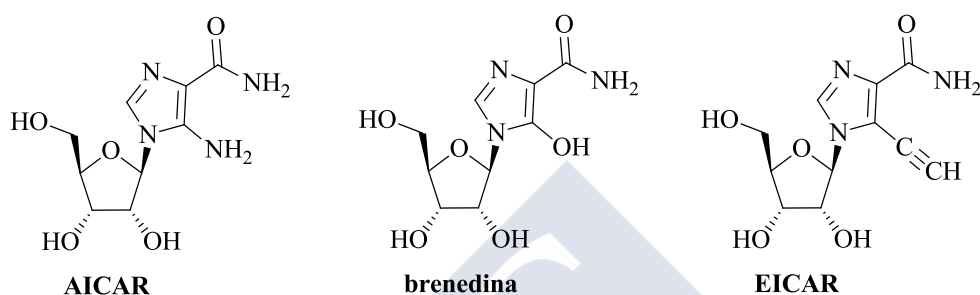
¹⁵¹ Scott, L. J.; Perry, C. M. *Drugs* **2002**, 62, 507.

¹⁵² Molina, Pérez, E.; Fernández-Castroaguin, J.; Dominguez-Muñoz, E. *Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, 35, 266.

¹⁵³ Sofia, M. J.; Bao, D.; Chang, W.; Du, J.; et al. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 7202.

¹⁵⁴ (a) Murakami, E.; Tolstykh, T.; Bao, H.; Niu, C.; et al. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 34337. (b) Gane, E. J. et al. *N. Engl. J. Med.* 2013, Artículo en prensa, DOI: 10.1056/NEJMoa1214853.

además de la ribavirina, otros compuestos estructuralmente derivados del 5-amino-1-β-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (**AICAR**) con la introducción de modificaciones en la posición 4 del heterociclo, por ejemplo la **brenedina**,¹⁵⁵ utilizada como inmunosupresor en el tratamiento de pacientes sujetos a trasplantes, o el 5-etinil-1-β-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (**EICAR**), con un amplio espectro de actividad frente virus ADN y ARN y la proliferación de células tumorales.¹⁵⁶



¹⁵⁵ Inou, T.; Kusaba, R.; Takahashi, I.; Sugimoto, H.; Kuzuhara, K.; Yamada, Y.; Yamauchi, J.; Otsubo, O. *Transplantation Proc.* **1981**, 8, 315.

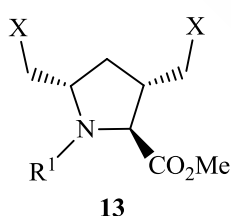
¹⁵⁶ Minakawa, N.; Takeda, T.; Sasaki, T.; Matsuda, A.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 778.

1.6. OBJETIVOS

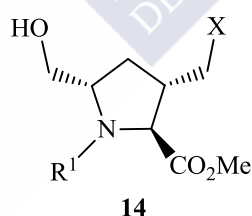
1.6.1. Síntesis de prolina-miméticos 3,5-disustituidos

El inicio del trabajo consistirá en la puesta a punto de diversas transformaciones químicas que permitan la preparación de prolina-miméticos tipos **13** y **14**, ya que, como previamente hemos comentado (apartado 1.1), la revisión bibliográfica previa al inicio de este trabajo indicó la escasez de derivados de prolina disustituidos en las posiciones 3 y 5. Parece pues, un objetivo sintético deseable desde un punto de vista químico-orgánico, y como contribución al desarrollo del tema de los compuestos prolina-miméticos, la puesta a punto de rutas de síntesis que permitan de forma eficiente la preparación de derivados de prolina con diferentes sustituyentes en posiciones 3 y 5, al objeto de conseguir diversidad funcional en dichas posiciones, para en una segunda parte del trabajo emplear algunos de ellos como compuestos prolina-miméticos en la preparación de derivados peptídicos biológicamente activos.

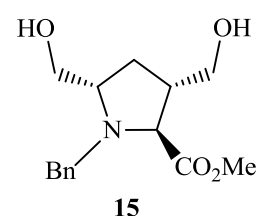
Para conseguir este primer objetivo, el dihidroxiéster **15**, preparado previamente en nuestro grupo de investigación, se presenta como un precursor adecuado, ya que mediante transformaciones sencillas sobre los grupos hidroximetilo, se podrá conseguir una amplia diversidad estructural en los correspondientes derivados de prolina igual o diferentemente sustituidos en posiciones 3 y 5.¹⁵⁷



R₁ = H, Bn, Boc
X = OH, OMs, OTs, OMe, N₃,
NH₂, NHAc, CN, 4-aryl-1,2,3-
triazol-1-yl



R₁ = H, Bn, Boc
X = OMs, OTs, OMe,
OEt, N₃, NH₂, 4-aryl-1,2,3-
triazol-1-yl



Parte de este trabajo ha sido ya publicado.¹⁵⁸

¹⁵⁷ Alves M. J.; García-Mera, X.; Vale, M. L. C.; Santos, T. P.; Aguiar, F. R.; Rodríguez-Borges, J. E.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7595.

¹⁵⁸ Ferreira da Costa, J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron* **2010**, 66, 6797.

1.6.2. Síntesis de tripéptidos análogos de los neuropéptidos GPE y PLG

Una vez alcanzado el primer objetivo y por lo tanto en posesión de un número representativo de derivados prolina-miméticos 3,5-disustituídos, así como demostrada la posibilidad de ampliar la síntesis a otros derivados diferentes, nos centraremos en nuestro *segundo objetivo*, de aplicación más inmediata en el ámbito de la Química Médica, consistente en demostrar la utilidad de alguna de las moléculas previamente propuestas (apartado 1.6.1) como miméticos de prolina en la síntesis de pequeños péptidos análogos de péptidos presentes en el organismo de los mamíferos y que desempeñan papeles relevantes en diversas funciones biológicas, en concreto se prepararán análogos de los tripéptidos GPE y PLG (Figura 14), buscando compuestos con actividad neuroprotectora de interés en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

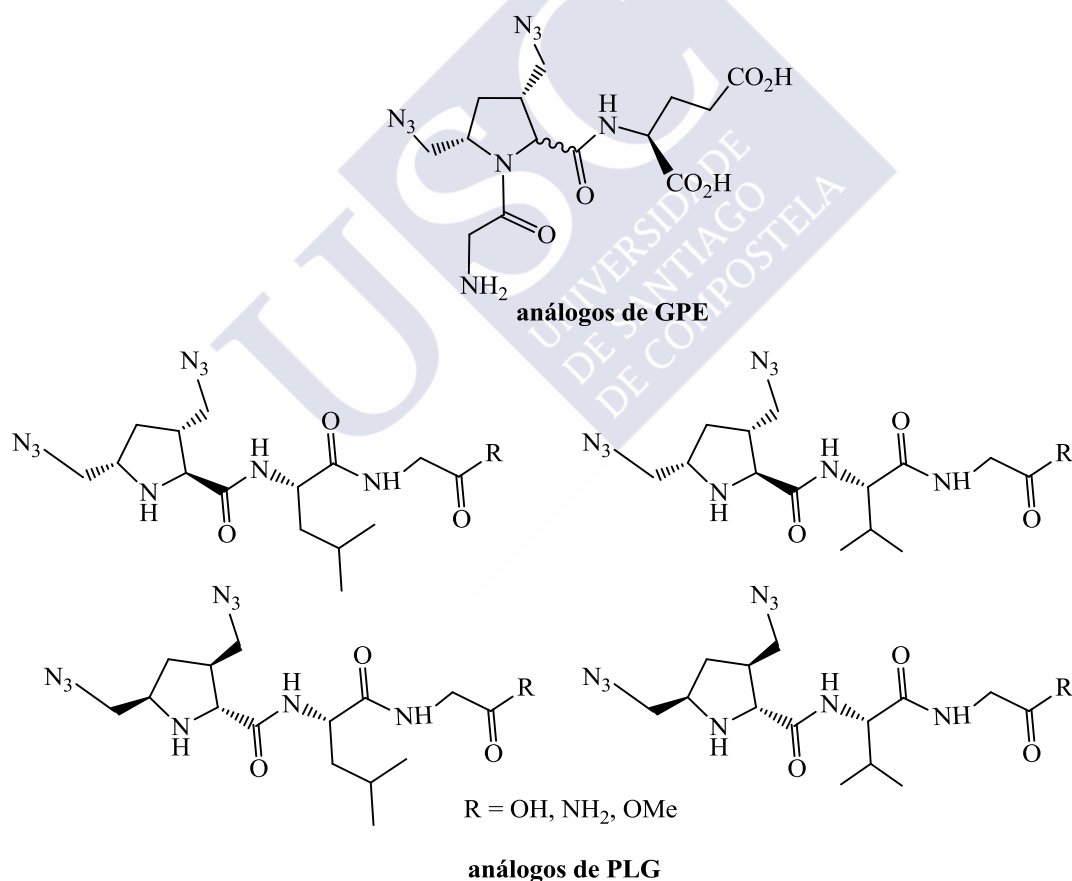
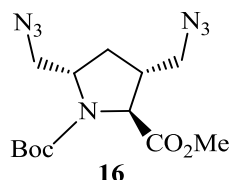


Figura 14

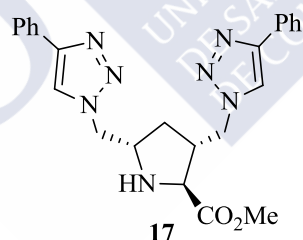
De entre los diversos compuestos prolina-miméticos previstos en el primer objetivo, centramos fundamentalmente nuestra atención en esta parte del trabajo en el (2*R**,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidometil)-1-*terc*-butiloxicarbonil-2-carboxilato de metilo (**16**), compuesto que se revela como un candidato versátil para iniciar la síntesis de los tripéptidos análogos al GPE y PLG, ya

que además de sustituir a la prolina en los tripéptidos objetivo, en posteriores transformaciones los grupos azida de los dipéptidos o tripéptidos inicialmente formados podrían conducir a nuevos péptidos.



En el grupo de los análogos de PLG, además de la sustitución de la L-prolina por el compuesto **16**, se introducirá un segundo cambio en la secuencia de amino ácidos, reemplazándose la L-leucina por L-valina, lo que conducirá a compuestos homólogos de los preparados en primer lugar, que nos permitirán comparar si influye esta propiedad en la actividad biológica de los correspondiente péptidos.

La síntesis de los análogos del GPE se abordará igualmente a partir de **16** y del derivado triazólico **17**, con el objetivo de programar nuevos péptidos disustituídos en posiciones 3 y 5 y valorar la conveniencia o no, de formar el sistema triazólico con anterioridad al establecimiento de los enlaces peptídicos.

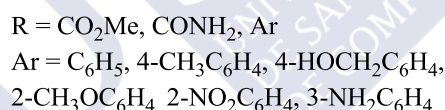
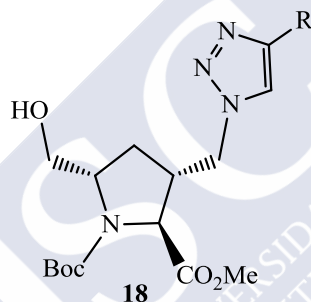


Como objetivo complementario a esta parte del trabajo, nos proponemos evaluar la actividad biológica de los análogos de PLG preparados como moduladores alostéricos de receptores D₂ de dopamina procedentes de caudado humano, mediante experimentos de competición agonista/antagonista utilizando la técnica de fijación de ligandos (“binding”). Dicho estudio será realizado en la **Unidad de Avaluación de Actividades Farmacológicas de Compuestos Químicos** de la Universidade de Santiago de Compostela.

1.6.3. Síntesis de 1'-homoisoazanucleósidos

1.6.3.1. 1'-Homoisoazanucleósidos portadores de bases atípicas

El hecho de que durante años nuestro grupo de investigación haya centrado una parte importante de sus esfuerzos en la síntesis y posterior evaluación biológica de carbanucleósidos, en los que se han introducido un elevado y variado número de modificaciones estructurales además del sistema carbocíclico del pseudoazúcar,^{159,160,161,162,163,164,165,166} incluyendo algunas de las denominadas bases atípicas,^{167,168} nos indujo a abordar el aprovechamiento sintético de alguno de los compuestos prolina-miméticos preparados en el ámbito de la síntesis de 1'-homoisoazanucleósidos tipo **18**, como agentes terapéuticos potenciales, fundamentalmente en el campo de los fármacos antivirales.



¹⁵⁹ Nieto, M. I.; Blanco, J. M.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Gómez, G. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7819.

¹⁶⁰ Hergueta, J. A. R.; López, C.; Fernández, F.; Caamaño, O.; Blanco, J. M.; *Tetrahedron-Asym.* **2003**, *14*, 3773.

¹⁶¹ Figueira, M. J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; García, M. D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 967.

¹⁶² Nieto, M. I.; Blanco, J. M.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Gómez, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2002**, *21*, 243.

¹⁶³ Figueira, M. J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Rodríguez-Borges, J. E.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *Synthesis* **2004**, 1991.

¹⁶⁴ Caamaño, O.; Gómez, G.; Fernández, F.; García, M. D.; García-Mera, X.; De Clercq, E. *Synthesis* **2004**, 2855.

¹⁶⁵ (a) Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synthesis* **2001**, 239. (b) Fernández, F.; García-Mera, X.; Morales, M.; Rodríguez-Borges, J. E.; De Clercq, E. *Synthesis* **2002**, 1084. (c) Fernández, F.; García Mera, X.; Morales, M.; Vilariño, L.; Caamaño, O.; De Clercq, E. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9253.

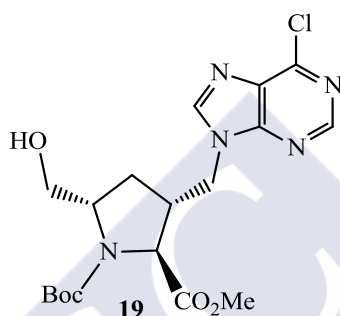
¹⁶⁶ (a) García, M. D.; Caamaño, O.; Fernández, F.; López, C.; De Clercq, E. *Synthesis* **2005**, 925. (b) García, M. D.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Abeijón, P.; Blanco, J. M. *Synthesis* **2006**, 73. (c) García, M. D.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Pérez-Castro, I. *Synthesis* **2006**, 3967.

¹⁶⁷ Pérez-Castro, I.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García, M. D.; López, C.; De Clercq, E. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3805.

¹⁶⁸ Pérez-Castro, I.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García, M.D.; López, C.; De Clercq, E. *ARKIVOC* **2010**, 152.

1.6.3.2. 1'-Homoazanucleósidos portadores de bases púricas

En la misma línea nos propusimos iniciar la preparación de 1'-*homo*azanucleósidos portadores de bases púricas, fundamentalmente la síntesis de la cloropurina **19**, que por sustitución del átomo de cloro en posición 6 del heterociclo rendirá los derivados de adenina o hipoxantina, o también establecer otras modificaciones en la posición 6 de la base, como 6-alcoxi-, 6-alquiltio, 6-alquilaminopurinas análogas, sin más que tratar el 6-cloro-derivado precursor con el correspondiente nucleófilo.





2. *QUÍMICA: PARTE TEÓRICA Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS*



2.1. DESARROLLO DE COMPUESTOS PROLINA-MIMÉTICOS

2.1.1. Planteamiento sintético

Para la síntesis de análogos de prolina sustituidos en posiciones 3 y 5 se podrían plantear diversas alternativas sintéticas. Nuestro grupo de investigación posee una amplia experiencia en la preparación del biciclo **20**, tanto de la forma racémica, como de los cuatro estereoisómeros enantioméricamente puros a partir de precursores y/o auxiliares quirales comerciales o previamente preparados¹⁶⁹ y ha trabajado en su aprovechamiento sintético dirigido a otros campos,¹⁷⁰ entre los que se incluye la síntesis de compuestos prolina-miméticos constreñidos tipo **21**,¹⁷¹ por ello ha sido esta la molécula elegida para el desarrollo de nuestros compuestos objetivo.

Por lo tanto, como hipótesis de partida asumimos que buena parte de estos derivados pueden ser asequibles por rutas sintéticas que tienen su origen en derivados de los ácidos *exo*- y *endo*-2-azabicyclo[2.2.1]ciclohept-5-eno-3-carboxílicos (**20**), que conducen, de una manera precisa, a los productos finales objetivo con una configuración dependiente de la ruta escogida y de la configuración (*endo/exo*; 1*R*/1*S*) del material de partida.

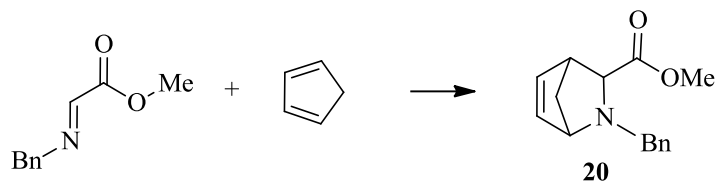
2.1.1.1. Síntesis de los amino hidroxí ésteres precursores **15** y **22**

En este contexto, la primera tarea a realizar consistirá en la obtención de cantidades suficientes del aducto **20**. Para ello, siguiendo antecedentes bibliográficos de nuestro grupo de trabajo, la reacción de aza-Diels-Alder entre ciclopentadieno y la imina formada entre el glioxilato de metilo y la bencilamina¹⁷⁰ (precursores accesibles tanto por su disponibilidad comercial y precio, como por la formación mayoritaria del aducto *exo*, de mayor interés para nuestros objetivos que el aducto *endo* (Esquema 1), constituye la mejor alternativa sintética a seguir.

¹⁶⁹ (a) Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4123. (b) Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron-Asymm.* **2000**, *11*, 4805. (c) Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Blanco, J. M. *Tetrahedron* **2001**, *42*, 5239.

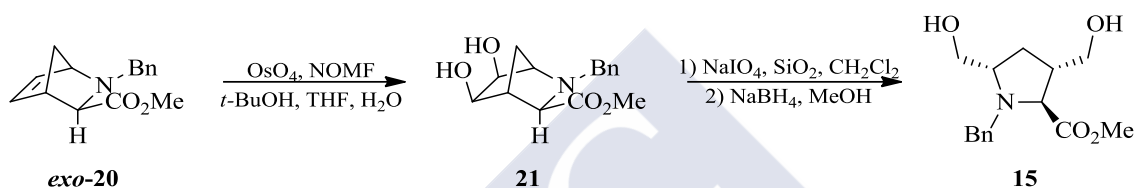
¹⁷⁰ (a) Blanco, J. M.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E.; Rodríguez-Hergueta, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5663. (b) Fernández, F.; García-Mera, X.; Vale, M. L. C.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synlett* **2005**, 319. (c) Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10951. (d) García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Vale, M. L. C.; Alves, M. J. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7162.

¹⁷¹ (a) Alonso, N.; Midón, P.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Fernández, F. *Síntesis de derivados de S-prolina sustituidos de interés como prolina-miméticos*. XV Congreso de la Sociedad Española de Química Terapéutica, San Lorenzo de El Escorial (Madrid), 11-14 de septiembre de 2007. (b) Midón, P.; García-Mera, X.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Rodríguez-Borges, J. E. *Síntesis de nuevos peptidomiméticos derivados de prolina con potencial actividad neuroprotectora*. 2º Simposio Iberoamericano de Química Orgánica (SIBEAQO-II), Santiago de Compostela, 8-12 de septiembre de 2010.



Esquema 1

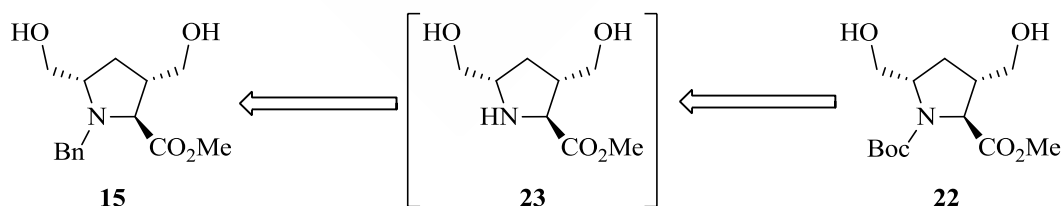
La posterior preparación del aminodiol **15**, se llevará a cabo, tal y como se ha descrito previamente, a partir del aducto aza-Diels-Alder correspondiente, mediante su hidroxilación al correspondiente *gem*-diol, **21** y posterior ruptura oxidativa del mismo^{170d} (Esquema 2):



Esquema 2

Un compuesto de partida alternativo para la preparación de los compuestos prolina-miméticos objetivo será el diol **22** (Esquema 3). La elección entre ambos posibles precursores **15** y **22** como intermediario sintético clave para la preparación de la mayor parte de los compuestos prolina-miméticos, se realizará tras un estudio comparativo inicial de la reactividad de ambos derivados.

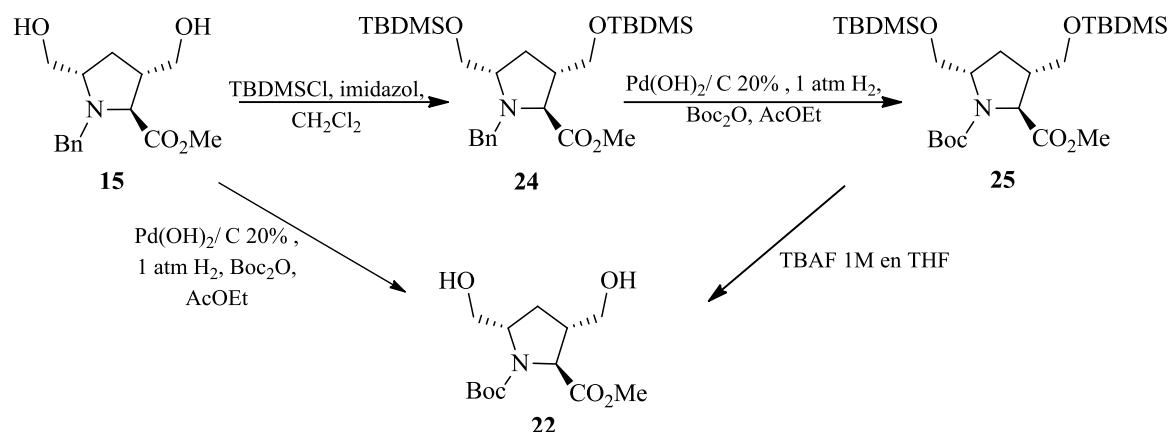
El diol **22** se podrá preparar con facilidad a partir de **15**, por hidrógenolisis del grupo bencilo (Bn) y posterior protección de la amina con dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc_2O) (Esquema 3).



Esquema 3

Esto se podrá realizar en un proceso en *tándem*, es decir hidrógenolisis del grupo bencilo en presencia del Boc_2O o mediante una vía sintética alternativa, que implicará inicialmente la formación del 3,5-bis(*tert*-butildimetilsilil) éter **24**, seguida del proceso anteriormente indicado, para obtener **25** que finalmente será tratado con fluoruro de *tert*-butiltrimetilamonio para rendir **22** (Esquema 4).

^{170d} García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Vale, M. L. C.; Alves, M. J. *Tetrahedron* **2011**, 67, 7162.

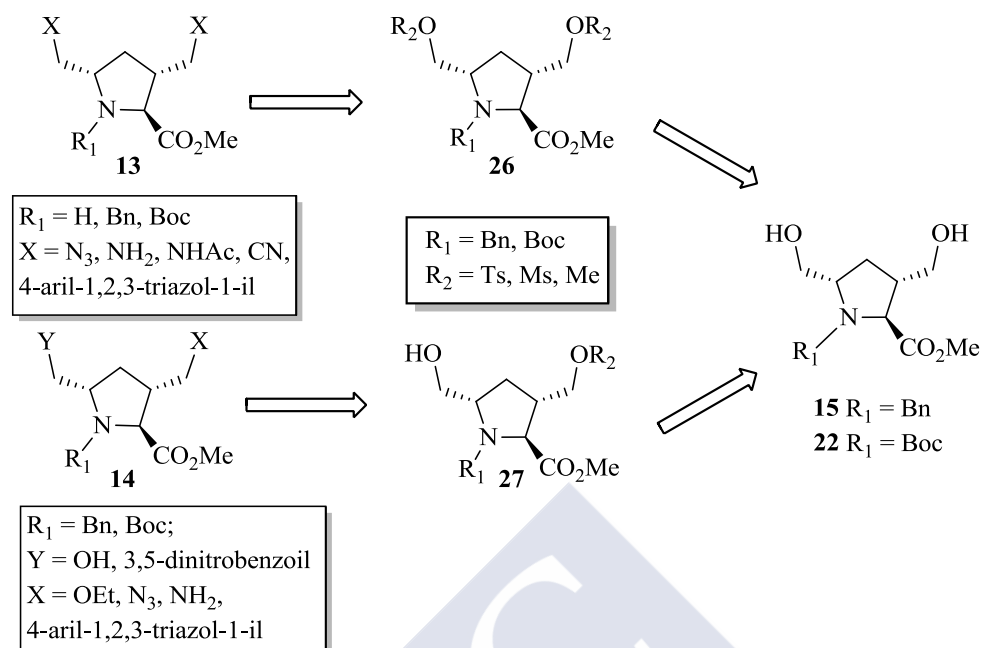


Esquema 4

Evidentemente, esta última vía resulta a priori más larga y costosa, pero nos permitirá disponer de derivados del amino alcohol **22** con los grupos hidroxilo enmascarados en forma de *tert*-butildimetilsilil éteres y su grupo amino protegido como *N*-bencilamina, **24** y carbamato de *tert*-butilo, **25**, que a su vez podrán ser empleados con comodidad como compuestos prolina-miméticos, por ejemplo en posteriores síntesis de péptidos y en el proceso de la ruta sintética que interese, sin desenmascarar los grupos hidroxilo.

2.1.1.2. Síntesis de derivados prolina-miméticos 3,5-disustituídos

Un análisis retrosintético básico (Esquema 5) muestra que los dioles **15** y/o **22**, serán los precursores más adecuados tanto para la síntesis de los prolina-miméticos 3,5 igualmente sustituidos, tipo **13**, o de los derivados diferentemente disustituídos, tipo **14**.



Esquema 5

Una vez preparados los dioles **15** y **22** se llevarán a cabo diversas transformaciones sobre sus grupos hidroxilo para acceder a los compuestos prolina-miméticos tipo **13** y **14**. Para ello, se ensayarán diversas transformaciones sobre los grupos hidroxilo o sobre sus derivados activados, como por ejemplo tosيلات y/o mesilatos tipo **26** y **27**, para introducir diversidad en las posiciones 3 y 5 del anillo de pirrolidina, y de esta forma alcanzar el primer objetivo que nos hemos planteado.

2.1.2. Desarrollo de los procesos sintéticos conducentes a los derivados prolina-miméticos 3,5 disustituídos

2.1.2.1. Reacción de Diels-Alder

La reacción de carbo-Diels-Alder,¹⁷² es uno de los métodos sintéticos más poderosos en química orgánica. La elevada regio- y estereoselectividad que se consigue, la sencillez de su ejecución y el hecho de que se puedan generar varios estereocentros nuevos de modo simultáneo, han dado lugar a innumerables aplicaciones de esta transformación en la construcción de objetivos altamente complejos, como por ejemplo en la síntesis total de productos naturales.^{173,174,175}

¹⁷² Diels, O., Alder, K. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, 98, 460.

¹⁷³ Carruthers, W. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*, Pergamon, Oxford, **1990**.

¹⁷⁴ Oppolzer, W. *Comprehensive Organic Synthesis*, Paquette, L. Ed., Pergamon, Oxford, **1991**.

¹⁷⁵ Coxon, J. M.; Foese, R. D. J.; Ganguly, B.; Marchand, A. P.; Morukuma, K. *Synlett* **1999**, 11, 1681.

La reacción de Diels-Alder es una cicloadición $[4\pi + 2\pi]$ que se considera generalmente de naturaleza concertada. Un mecanismo de reacción concertado requiere sólo un estado de transición en el camino entre los reactivos y el aducto. El estado de transición para una reacción Diels-Alder concertada requiere que el dieno adopte la conformación *s-cis*. El dieno y el alqueno, (llamado *dienófilo*), se acercan uno al otro en planos aproximadamente paralelos, permitiendo las propiedades de simetría de los orbitales interacciones estabilizantes entre los carbonos 1 y 4 del dieno y los dos carbonos del dienófilo (Figura 15).

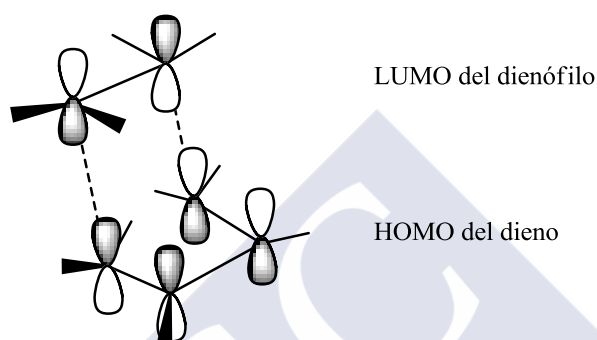


Figura 15. Cicloadición de un alqueno y un dieno, mostrando la interacción del LUMO del alqueno con el HOMO del dieno.

Para un dienófilo asimétrico, hay dos posibles orientaciones estereoquímicas con respecto al dieno, denominadas *endo* y *exo*. En el estado de transición *endo*, el sustituyente de referencia en el dienófilo se encuentra orientado hacia los orbitales π del dieno, mientras que en el estado de transición *exo*, el sustituyente de referencia se encuentra orientado de forma que se haya alejado del sistema π .¹⁷⁶

Otra característica estereoquímica de esta reacción es que el dieno y dienófilo se alinean de modo que se forma el producto *endo* en vez del producto alterno *exo*. El aducto *endo* es habitualmente termodinámicamente más inestable que el aducto *exo*, pero se forma más rápido. Esto se explica a menudo mediante las “interacciones orbitarias secundarias” (Figura 16). Las interacciones orbitarias primarias dan lugar a la formación de enlaces entre los átomos implicados, mientras que las interacciones secundarias no. Se piensa que estas interacciones orbitarias secundarias estabilizarían el estado de transición *endo* con respecto al estado de transición *exo*.

¹⁷⁶ Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry*, Plenum Press, **1990**, vol. A-B.

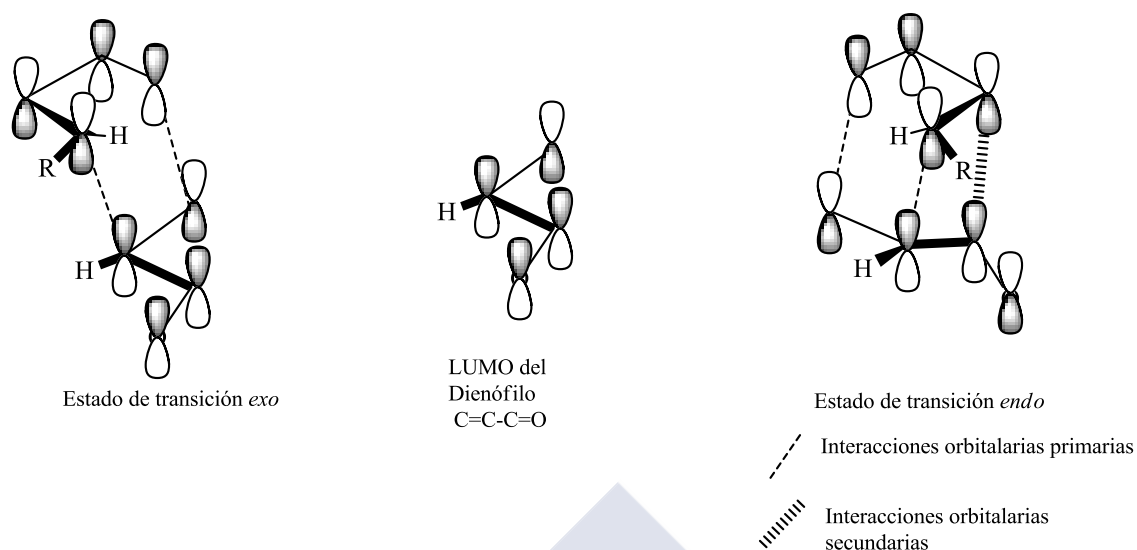


Figura 16

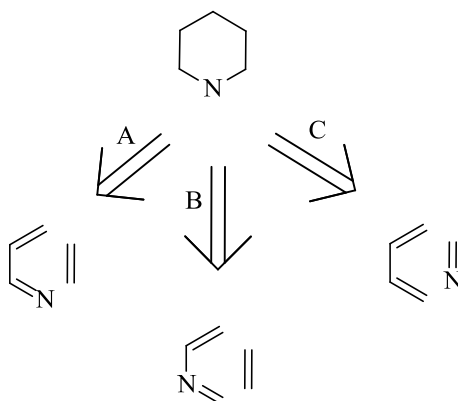
En este contexto no sólo hay que destacar la importancia de la naturaleza de los grupos funcionales unidos al dieno y/o al dienófilo, sino también la influencia de otros factores,¹⁷⁷ como puede ser la catálisis con ácidos de Lewis, la influencia de la polaridad del disolvente, presión, temperatura, empleo de ultrasonidos, etc., enfocado todo ello a una mejora de los rendimientos químicos y/o de las relaciones estereoselectivas.

2.1.2.2. Reacción de aza-Diels-Alder. Síntesis de la mezcla de aductos *exo/endo*-20

Las reacciones de cicloadición [4 + 2] en las que los átomos de carbono del dieno y/o dienófilo están total o parcialmente reemplazados por heteroátomos se conocen como reacciones de hetero-Diels-Alder. Si el heteroátomo que sustituye al carbono es el de nitrógeno, reciben el nombre de reacciones de aza-Diels-Alder.

La reacción de aza-Diels-Alder tiene tres variantes básicas que se pueden observar en el esquema retrosintético conducente a síntesis de la piperidina (Esquema 6):

¹⁷⁷ (a) Sauer, J.; Sustmann, R. *Angew.Chem. Int. Ed.* **1980**, 19, 779. (b) Streitwieser, A.; Heathcock, C. H. *Química Orgánica*, Interamericana, **1986**. (c) Houk, K. N.; *Tetrahedron Lett.* **1970**, 2621. (d) Birney, D. M.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4127. (e) Jorgensen, W. L.; Lim, D.; Blake, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2936.



Esquema 6

En la primera y segunda variantes (1-aza y 2-azadienos), la función imina se encuentra formando parte de la estructura del dieno, mientras que en la tercera y más común de las variantes, la imina forma parte del dienófilo.^{178,179}

1-Azadienos (ruta A). Los 1-azadienos se han mostrado particularmente caprichosos en las reacciones de cicloadición [4 + 2], viéndose a menudo frustrada la reacción debido a reacciones del grupo imina, que tienen lugar de modo competitivo. Esta ruta no ha mostrado ser importante para la síntesis asimétrica de piperidinas sustituidas, a pesar de que ha sido posible la unión de auxiliares quirales al átomo de nitrógeno.

2-Azadienos (ruta B). También se han estudiado los 2-azadienos como materiales de partida para la síntesis de compuestos basados en el anillo de piperidina *via* reacción de Diels-Alder. Desafortunadamente, las versiones asimétricas generales de estas reacciones han sido esquivas y no hay un método simple por medio del cual se pueda unir un auxiliar quiral, que posteriormente pueda ser eliminado.

3-Iminas como dienófilos (ruta C). La reacción de Diels-Alder de iminas o sales de iminio con carbodienos es una de las rutas más eficiente para la síntesis de piperidinas. Las iminas se pueden obtener fácilmente a partir de la condensación de aldehídos y cetonas con las correspondientes aminas, lo cual permite disponer de una gran variedad de iminodienófilos como sustratos. El uso de iminas como aza-dienófilos en reacciones de cicloadición [4 + 2], ya fue mencionada por Alder en 1943.¹⁸⁰

Las reacciones de aza-Diels-Alder más comúnmente empleadas en síntesis son del tipo HOMOdieno controlada, “tipo normal”, en las que se utiliza un dienófilo electrón-deficiente. Para la

¹⁷⁸ Buonora, P.; Olsen, J. C.; Taboem, O. *Tetrahedron* **2001**, 57, 6099.

¹⁷⁹ Bailey, P.; Millwood, P.; Smith P. *Chem. Com.* **1998**, 633.

¹⁸⁰ Alder, K. *Newer methoden der praperative organischen chemie*, Verlag Chemie, Weinheim, **1943**.

activación de iminodienófilos, un método clásico consiste en la utilización de grupos electroattractores tales como carbonilo y sulfonilo, y aunque los carbonilos son mejores activantes, cualquiera de ellos activa más al iminodienófilo cuando se encuentran unidos en el carbono en vez de en el nitrógeno. Otra forma activar los dienófilos sería por ejemplo, protonar el nitrógeno de la función imina o mediante el empleo de un ácido de Lewis.

Al igual que ocurre en las carbociclaciones, en las reacciones de aza-Diels-Alder enantioselectivas, se hace uso de un auxiliar quiral que puede encontrarse unido al (aza) dieno y/o al azadienófilo, o bien se utilizan catalizadores quirales con reactivos aquirales.

En lo que se refiere a las síntesis estereoselectivas mediante el empleo de auxiliares quirales, recientemente se han investigado varias posibilidades de cicloadiciones de iminas y dienos.

El empleo de aza-dienófilos no quirales en la reacción de aza-Diels-Alder supone la obtención de los aductos (\pm)-*exo* y (\pm)-*endo* (respecto al grupo éster), como mezcla racémica en todos los casos, dado que el dieno puede acercarse con la misma probabilidad por ambas caras del dienófilo (sal de iminio).

Sin embargo, la introducción de auxiliares quirales en el grupo éster del azadienófilo, partiendo de los glioxilatos quirales, supone la obtención de cuatro aductos diastereómeros 1*R,exo*, 1*S,exo*, 1*R,endo* y 1*S,endo* en proporciones diversas, con la posibilidad de que predomine algún diastereómero frente a todos los demás, dependiendo de la inducción quiral-estérica que pueda conferir dicho auxiliar. Además, los cuatro diastereómeros son susceptibles de separación por métodos físicos (cristalización fraccionada, cromatografía, etc.). Se han utilizado, como auxiliares quirales, iminas derivadas de diversos glioxilatos quirales^{181,170a,182} como mentilo, bornilo, 8-fenilmentilo o pantolactona entre otros.

Stella y col.¹⁸³ han propuesto un mecanismo que describe los pasos fundamentales para la activación del dienófilo: inicial adición nucleófila de la bencilamina (I) al glioxilato de metilo (II) (Esquema 7) para formar la imina III, cuya posterior protonación por el ácido trifluoroacético genera la sal de iminio correspondiente IVa, que se encuentra en equilibrio con la forma isomérica iónizada IVb, mejor dienófilo, desplazándose el equilibrio hacia la formación de la misma mediante la adición del trifluoroboroeterato, lo que conduce al intermediario V. Como en el proceso de cicloadición el

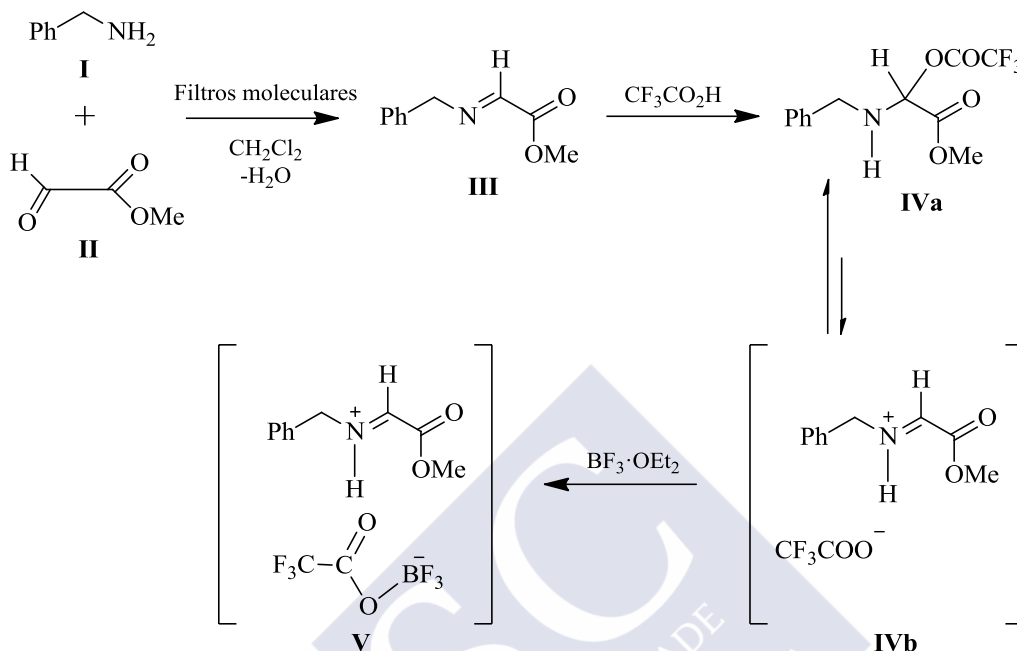
¹⁸¹ Hamley, P.; Helmchen, G.; Holmes, A. B.; Marshall, D. R.; MacKinnon, J. W.; Smith, D. F.; Ziller, J. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 786.

^{170a} Blanco, J. M.; Caamaño, O.; Fenández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E.; Rodríguez Hergueta, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5663.

¹⁸² Bauer, T.; Szymanski, S.; Jezewski, A.; Gluzinski, P.; Jurczack, J. *Tetrahedron-Asymm.* **1997**, 8, 2619.

¹⁸³ Stella, L.; Abraham, H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2603.

ciclopentadieno se puede aproximar con la misma probabilidad a ambas caras del dienófilo V, se podrán obtener los cuatro isómeros, un par de enantiómeros *exo* y un par de enantiómeros *endo*.¹⁸³



Esquema 7

Resultados propios

Para la preparación del aducto *exo*-**20**, decidimos iniciar el trabajo con compuestos racémicos, ya que el mayor coste que implica la utilización de compuestos enantioméricamente puros solo estaría justificado una vez comprobada la viabilidad de la síntesis de los compuestos prolina-miméticos objetivo, así como su utilidad en la preparación de peptidomiméticos y 1'-*homo*azanucleósidos y la posterior evaluación de su actividad biológica. Además, en el caso de la síntesis de los compuestos peptidomiméticos, cabe la posibilidad de una resolución diastereomérica en las fases de formación de los dipéptidos o tripéptidos análogos, por reacción de los derivados prolina-miméticos tipo **13** y/o **14** con los correspondientes aminoácidos naturales, enantioméricamente puros.

La preparación de los compuestos **20** se abordó, tal y como se describe previamente,^{170c} mediante activación del hemiacetal del glioxilato de metilo por reacción con cantidades equimoleculares de bencilamina, ácido trifluoroacético y trifluoroboroeterato en diclorometano seco y adición final de ciclopentadieno recientemente despolimerizado. De esta forma se obtuvo la mezcla de los cicloaductos racémicos **20**, de la cual se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente hexano/AcOEt, 6:1) de un primer grupo de fracciones el aducto mayoritario *exo*-**20**

^{170c} Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10951.

(59%), de un segundo grupo de fracciones una mezcla *endo/exo-20* (8%) enriquecida en *endo-20*, y finalmente de un último grupo de fracciones el aducto minoritario *endo-20* puro (7%).

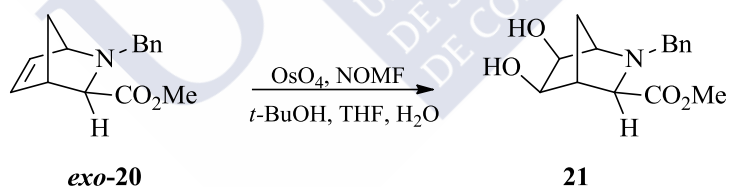
Que el compuesto mayoritario en el proceso de cicloadición sea el aducto *exo-20*, se debe al impedimento estérico provocado por el radical bencilo, que favorece la aproximación al ciclopentadieno principalmente por el lado opuesto al que se dispone este grupo y también a que el ciclopentadieno se aproxima con una disposición espacial con el puente metileno orientado hacia atrás.

2.1.2.3. Síntesis del 3,5-bis(hidroximetil)éster 15

2.1.2.3.1. Síntesis del dihidroxiéster bicíclico 21

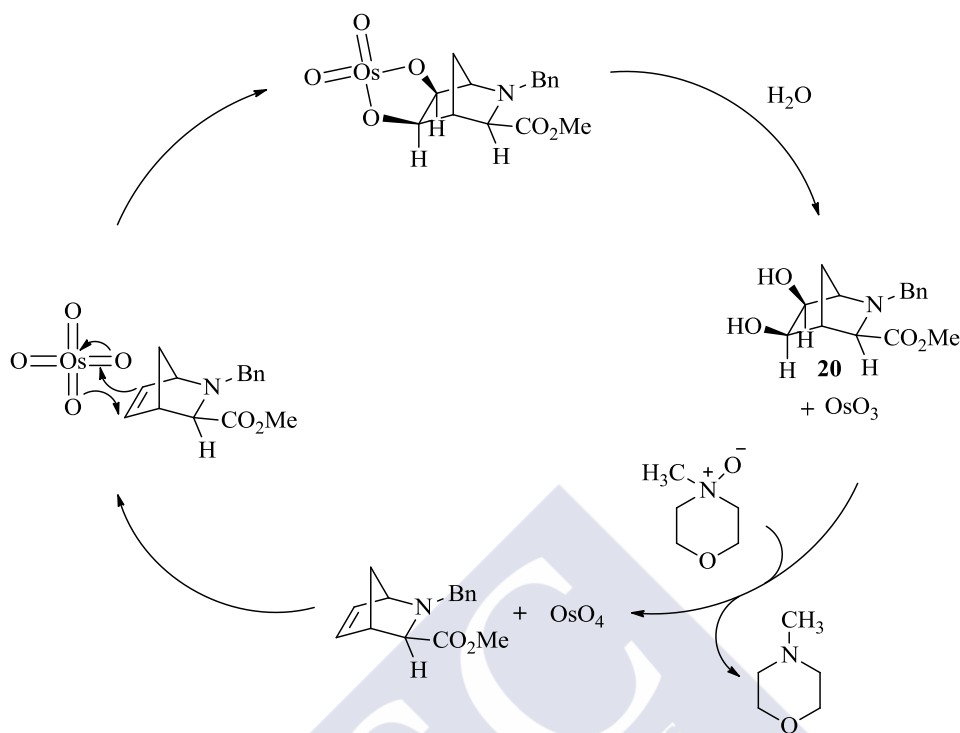
Dihidroxilación de alquenos

La hidroxilación de un alqueno conduce a la adición de un grupo hidroxilo a cada uno de los carbonos que forman parte del doble enlace. Entre otras alternativas, se puede realizar empleando tetraóxido de osmio, en presencia de *N*-óxido de 4-metilmorfolina y ha sido este el método elegido por nosotros para la preparación del dihidroxiéster **21** a partir del aducto *exo-20*, alcanzándose un rendimiento del 90%.



Esquema 8

Inicialmente ocurre una adición concertada del OsO_4 al doble enlace (Esquema 9) dando lugar al compuesto cíclico conteniendo Os(VI) . La reacción es estereoselectiva y se obtiene el producto *sin*, los dos átomos de oxígeno se introducen por el mismo lado del doble enlace. El intermediario formado se transforma en el correspondiente diol por hidrólisis. Debido a su gran toxicidad, el OsO_4 se emplea en cantidades catalíticas combinado con un segundo oxidante, NOMF, en cantidades estequiométricas que tiene como función reoxidar el osmio reducido en el proceso.

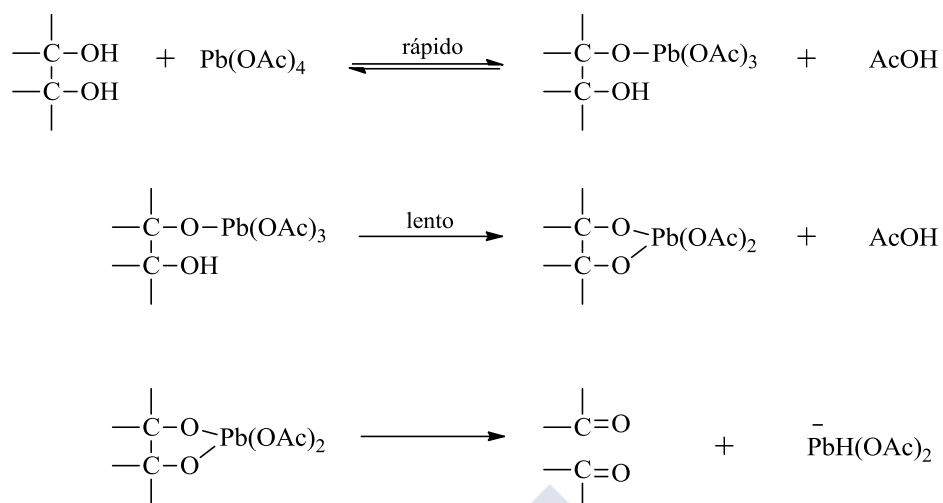


Esquema 9

Ruptura oxidativa de dioles

Los glicoles 1,2 se rompen fácilmente y con buen rendimiento en condiciones suaves empleando HIO₄ o Pb(OAc)₄,¹⁸⁴ en la reacción se forman dos moles de aldehído o cetona o bien un mol de cada uno de ellos, dependiendo de la sustitución en los carbonos del diol de partida. Los rendimientos suelen ser tan buenos, que las olefinas son a menudo convertidas en glicoles y después rotas en estas condiciones como alternativa preferente a la ruptura directa del doble enlace con ozono, dicromato potásico o permanganato potásico.

¹⁸⁴ Haines, A. H. *Methods for the Oxidation of Organic Compounds*, Academic Press, New York, **1988**, vol. 2, p. 277.



Esquema 10

La elección del ácido peryódico o del tetraacetato de plomo, como agentes a emplear, depende de varios factores. Así, el ácido peryódico es más adecuado para ser utilizado en medio acuoso y el tetraacetato de plomo en disolventes orgánicos. En general, el ácido peryódico es más selectivo como agente para ruptura de glicoles debido a que el tetraacetato de plomo también puede provocar, sobre determinados sustratos, otras reacciones que compiten con la ruptura oxidativa; por ello, la estructura del glicol representa también un factor a considerar a la hora de decidir el oxidante a utilizar.

El mecanismo de la oxidación de glicoles con $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ propuesto por Criegee (esquema 10),¹⁸⁵ viene avalado por una serie de hechos:

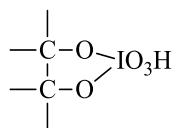
- 1) la cinética de la reacción es de segundo orden (primer orden en cada reactivo),
- 2) la liberación de ácido acético retarda la reacción (desplaza el primer equilibrio hacia la izquierda),
- 3) los glicoles *cis* reaccionan mucho más rápido que los *trans*, lo que justifica la formación del intermediario cíclico.¹⁸⁶

En el caso del ácido peryódico el mecanismo de acción propuesto es similar, presentando el intermediario cíclico la estructura que se indica:¹⁸⁷

¹⁸⁵ Criegee, R.; Kraft, L.; Rank, B. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1933**, 507, 159.

¹⁸⁶ Criegee, R.; Höger, E.; Huber, G.; Kruck, P.; Marktsheffel, F.; Schellenberger, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1956**, 599, 81.

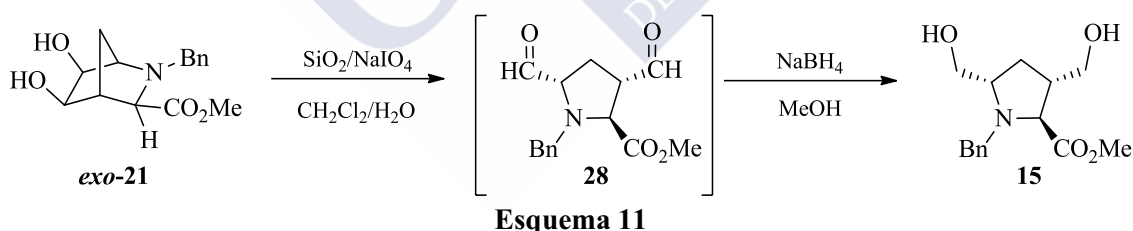
¹⁸⁷ (a) Buist, G. J.; Bunton, C. A.; Miles, J. H. *J. Chem. Soc.* **1959**, 743; (b) Buist, G. J.; Bunton, C. A.; Hipperson, W. C. P. *J. Chem. Soc.* **1971**, 2128.



Con frecuencia en vez del ácido peryódico emplean sales del mismo como $NaIO_4$ o KIO_4 , en estos casos las reacciones generalmente se llevan a cabo en el seno de alcoholes o THF acuosos, ya que la efectividad de estos oxidantes en disolventes poco polares se ve limitada por su insolubilidad. Para salvar estos problemas, se han desarrollado diversas modificaciones del método que emplean $NaIO_4$ soportado sobre gel de sílice,^{188,189} entre las que destaca la puesta a punto por Zhong y Shing,¹⁹⁰ de gran eficacia para la transformación de glicoles vecinales en aldehídos, consistente en la adición de gel de sílice a una disolución acuosa de metaperyodato sódico, generando un reactivo oxidante, que puede ser almacenado durante un mes sin pérdida apreciable de actividad. La escisión del glicol transcurre suave y rápidamente y al final un simple proceso de filtración y eliminación del diclorometano a sequedad conduce al aldehído virtualmente puro con excelente rendimiento.

Resultados propios

En nuestro caso, la ruptura oxidativa del diol **21** se realizó empleando las condiciones desarrolladas por Zhong y Shing¹⁹⁰ en un proceso en *tándem* de oxidación-reducción (Esquema 11), de forma que el dialdehído generado es inmediatamente reducido con $NaBH_4$, para dar el compuesto **15** con un rendimiento del 79%.



2.1.2.4. Hidrogenación catalítica: hidrógenolisis de enlaces C-N y reducción de azidas

La hidrogenación es una reacción entre el hidrógeno molecular (H_2) y otro compuesto o elemento, normalmente en presencia de un catalizador (hidrogenación catalítica). Este proceso se utiliza para reducir o saturar compuestos orgánicos y consiste en la adición de pares de átomos de hidrógeno a una molécula, con frecuencia a alquenos.¹⁹¹

¹⁸⁸ Gupta, D. N.; Hodge, P.; Davies, J. E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1981**, 2970.

¹⁸⁹ Daumas, M.; Vo-quang, Y.; Vo-quang, L.; Gaffic, F. L. *Synthesis* **1989**, 64.

¹⁹⁰ Zong, Y-L.; Shing, T. K. M. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2622.

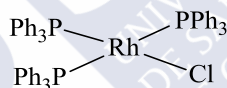
¹⁹¹ Miloš, H. *Reductions in Organic Chemistry*, 2nd ed., American Chemical Society, Washington DC, **1996**.

2.1.2.4.1. Catalizadores de hidrogenación

Los catalizadores empleados son de dos tipos, *homogéneos* y *heterogéneos*. Los catalizadores homogéneos son solubles en los disolventes de la reacción que contiene el sustrato no saturado, mientras los catalizadores heterogéneos son sólidos suspendidos en la disolución del sustrato a hidrogenar; la mayoría de las hidrogenaciones se realizan con este último tipo de catalizadores.

Su actividad catalítica y selectividad dependen en gran manera del metal que se emplea como catalizador, para que pueda aceptar y disociar H_2 ha de tener un número bajo de orbitales *d* vacantes, ya que si este es muy elevado el hidrógeno será muy fuertemente adsorbido y por ello muy difícil de desorber, siendo los metales del grupo 8 los que proporcionan mejores catalizadores, ya que los complejos de hidruro que forman no son tan estables.¹⁹² En la práctica, Pt, Pd, Ni, Rh y Ru son los catalizadores más empleados en las hidrogenaciones, dadas sus capacidades para quimioadsorber disociativamente H_2 , cuando se usan como superficies metálicas y para coordinar H mediante un proceso de adición oxidativa en el caso de que el catalizador sea un complejo.

Como ejemplo de catalizadores homogéneos, tenemos el catalizador de Wilkinson, en honor del fallecido químico organometálico y premio Nobel de Química en 1973, Sir Geoffrey Wilkinson,¹⁹³ nombre con el que se conoce al clorotris(trifenilfosfina)rodio(I).



La actividad y selectividad de los catalizadores homogéneos se puede ajustar cambiando los ligandos, así en el caso de sustratos proquirales, la selectividad del catalizador se puede adecuar para favorecer la formación de un compuesto enantioméricamente puro.

Los catalizadores heterogéneos son los más comúnmente empleados en los procesos industriales de hidrogenación y, al igual que en el caso de los catalizadores homogéneos, la actividad se ajusta a través de cambios ambientales en los alrededores del metal, es decir en la esfera de coordinación. Frecuentemente se usa el Pd en forma de un polvo muy fino o también el hidróxido de paladio $[Pd(OH)_2]$ “soportados” en un material inerte, como carbón vegetal (Pd/C), para así incrementar el área superficial de los mismos. El platino se suele usar en forma de PtO_2 , conocido como catalizador de Adams en honor de su descubridor, Roger Adams.

¹⁹² F. H. Jardine. *Rhodium: Inorganic and Coordination Chemistry*. Enc. Inorg. Chem. Bruce King, R. Ed., John Wiley & Sons, London, **1994**, vol 6, p. 3488.

¹⁹³ (a) Birch, A. J.; Williamson, D. H. *Org. React.* **1976**, 24, 1. (b) James, B. R. *Homogeneous Hydrogenation*, John Wiley & Sons, New York, **1973**.

Un catalizador cuidadosamente seleccionado se puede utilizar para hidrogenar algunos grupos funcionales sin afectar a otros, como la hidrogenación selectiva de alquinos a alquenos con el catalizador de Lindlar (paladio sobre carbonato de calcio desactivado por acetato de plomo).

2.1.2.4.2. Proceso de hidrogenación catalítica

El proceso de hidrogenación transcurre de una manera secuencial, primero tiene lugar la adsorción de H_2 en la superficie del catalizador, para seguidamente formarse el complejo catalizador-alqueno, mediante la interacción del orbital vacío del metal con el orbital ocupado π del alqueno. La posterior transferencia del hidrógeno al doble enlace y difusión del compuesto saturado formado en el medio, alejándose del catalizador (Figura 17). La estereoquímica de la hidrogenación es *sin* ya que ambos átomos de hidrógeno se adicionan al doble enlace desde la misma superficie del catalizador.

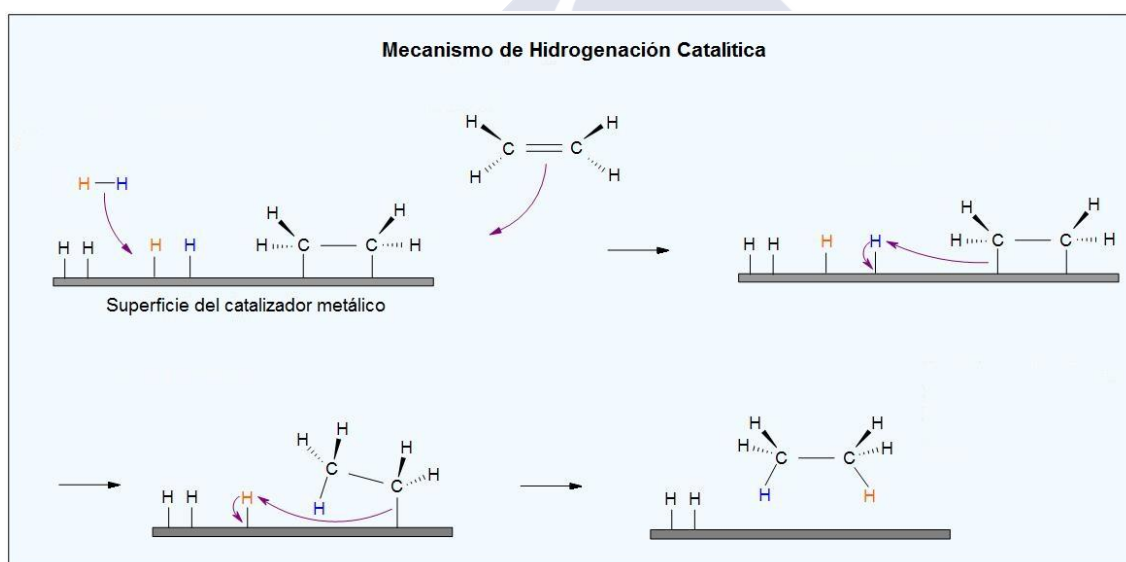


Figura 17: Mecanismo de Hidrogenación Catalítica.

Para la mayoría de las hidrogenaciones se usa hidrógeno gaseoso (H_2), sin embargo en algunos casos se pueden emplear fuentes alternativas de hidrógeno; a estos procesos se les denomina *hidrogenaciones de transferencia* y consisten en la utilización de sustancia donantes de H_2 , es decir capaces de liberar hidrógeno y que a menudo también sirven como disolventes, entre los que se incluyen: hidrazina, dihidronaftaleno, dihidroantraceno, isopropanol y ácido fórmico. La hidrogenación de transferencia es muy útil para la reducción asimétrica de sustratos insaturados polares, como cetonas, aldehídos e iminas.¹⁹⁴

¹⁹⁴ van Es, T.; Staskun, B. *Org. Syn.* **1988**, 6, 631.

La hidrogenación catalítica es una de las reacciones más utilizadas síntesis química, siendo muchos los grupos funcionales que pueden reducirse bajo estas suaves condiciones y frecuentemente con una alta quimio-, regio- y estereoselectividad. Además, finalizado el proceso de reducción el hidrógeno puede liberarse del catalizador heterogéneo y este ser eliminado por filtración del medio de reacción, dando lugar a una disolución libre de contaminantes. Los catalizadores homogéneos no se pueden eliminar de la misma manera y esta es su mayor desventaja.¹⁹¹

2.1.2.4.3. Proceso de hidrógenolisis catalítica

Se denomina así a la reacción en que se rompe un enlace C-X (X = O, S, N) por acción del H₂ y en presencia de un catalizador, formándose dos nuevos enlaces C-H y H-X. Entre las aplicaciones más comunes de este proceso se encuentran las X-desbencilaciones.

Esta reacción puede ser empleada para la ruptura de enlaces entre el radical bencilo y el oxígeno, empleando para ello catalizadores de paladio. El proceso transcurre fácilmente, se emplea para la desprotección de grupos amino bloqueados mediante el radical benciloxicarbonilo (Z), uno de los grupos protectores más utilizados en síntesis orgánica, sobre todo en síntesis de péptidos, dada la facilidad con la que este puede ser eliminado en presencia de otros grupos funcionales sensibles.

La eliminación de los grupos protectores S-bencilo es bastante difícil ya que el azufre es propenso a provocar el envenenamiento del catalizador.

Aunque la hidrógenolisis del enlace N-bencilo ocurre con más dificultad que la de un enlace O-bencilo, esta reacción es de gran utilidad en síntesis orgánica y ha sido aplicada a una gran variedad de N-bencilaminas, que han sido desbenciladas mediante hidrogenación catalítica en condiciones suaves con buenos rendimientos y sin generar cantidades importantes de productos secundarios.¹⁹⁵ Entre los muchos catalizadores ensayados, como en las O-desbencilaciones, los mejores catalizadores son sin duda los del paladio, obteniéndose excelentes resultados como los alcanzados con el catalizador de Pearlman (Pd(OH)₂/C 20%).¹⁹⁶

2.1.2.4.4. N-Desbencilación del compuesto **15**. Síntesis de los ésteres metílicos **22** y **29**

Inicialmente sobre el compuesto **15** se ensayó la alternativa sintética que se inicia con la protección de sus grupos hidroxilos como *terc*-butildimetilsilil éteres (Esquema 12) y sobre el

¹⁹¹ Miloš, H. *Reductions in Organic Chemistry*, 2nd ed., American Chemical Society, Washington DC, **1996**.

¹⁹⁵ Hartung, W. H.; Siminiff, R. *Org. React.* **1953**, 7, 263.

¹⁹⁶ Pearlman, W. M. *Tetrahedron* **1967**, 1663.

compuesto formado, **25**, se ensayaron diversas condiciones para la eliminación del grupo bencilo (Tabla 1).

Los éteres de silicio son uno de los grupos protectores más habituales de la función alcohol, tienen la ventaja de ser bastante estables frente a una gran variedad de reactivos orgánicos y de ser fácilmente eliminables en condiciones que no alteran otros grupos funcionales; además presentan una excelente estabilidad frente a bases pero son relativamente sensibles a ácidos. En concreto, los éteres de *terc*-butildimetilsililo y de *terc*-butildifenilsililo son los grupos protectores sililados más usados en síntesis orgánica.¹⁹⁷ La metodología desarrollada por Corey y col.,¹⁹⁸ consistente en tratar el alcohol con TBDMSCl e imidazol en diclorometano a temperatura ambiente permite la protección de alcoholes con buenos rendimientos y fue la elegida por nosotros para la preparación de **24**, obteniéndose un rendimiento del 92% a partir de **15**.

Para la desbencilación de **24** a **29** se realizaron diversos ensayos. En lugar primer se ensayó la hidrógenolisis catalítica (Tabla 1, entrada 1), no consiguiéndose los resultados esperados aun después de un tiempo de reacción largo; por ello se recurrió a un método de transferencia de hidrógeno, que emplea formiato amónico y paladio sobre carbón, (Tabla 1, entrada 2), reportado como muy eficaz para la ruptura de este tipo de enlaces por Answer y Spatola,¹⁹⁹ con conclusiones todavía más desalentadoras, ya que además de no aislarse el compuesto esperado **29**, se pierde la totalidad del material de partida.

Tabla 1. Ensayos de desbencilación del compuesto **24**

Ensayo	Reactivos	Disolvente	T (°C)	t (días)	Resultado
1	H ₂ (1 atm) Pd/C 10% ²⁰⁰	EtOH	25	5	24 (60%) + mezcla de compuestos no identificados
2	HCO ₂ NH ₄ Pd/C 10% ¹⁹⁹	MeOH	65	8	Mezcla de compuestos no identificados
3	H ₂ (1 atm) Pd(OH) ₂ /C 20% ²⁰¹	AcOEt	25	7	29 (42%)

¹⁹⁷ Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3^{er} ed., John Wiley & Sons, New York, **1991**.

¹⁹⁸ Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6190.

¹⁹⁹ Answer, M. K.; Spatola, A. F. *Synthesis* **1980**, 929.

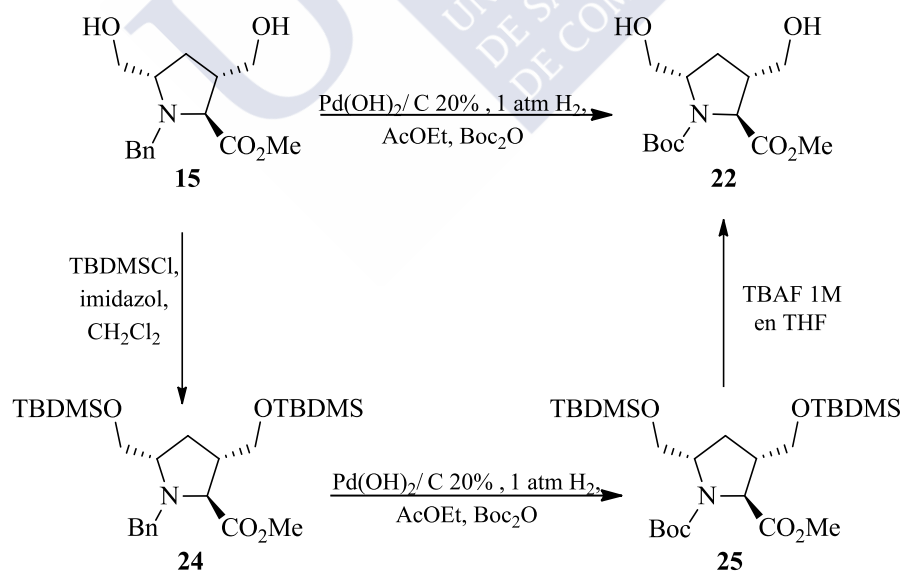
²⁰⁰ Goldstein, S.W.; Overman, L. E.; Rabinowitz, M. H. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1179.

²⁰¹ Valls, N.; López-Canet, M.; Vallibera, M.; Bonjoch, M. *J. Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3446.

A la vista de estos resultados, se abordó de nuevo la hidrogenación catalítica pero empleando como catalizador $\text{Pd}(\text{OH})_2$ en vez de Pd metal, aislándose finalmente tras la elaboración habitual y purificación por cromatografía en columna el compuesto **29**, aunque no con muy buen rendimiento (Tabla 1, entrada 3). Estos resultados parecen confirmar la dependencia de los procesos de hidrógenolisis de los catalizadores utilizados.

Finalmente se optó por captar el compuesto **29** como su correspondiente carbamato de *tert*-butiloxycarbonilo en el propio medio de reacción. Para ello **24** se sometió de nuevo a hidrogenación catalítica en las condiciones anteriores, complementadas con el tratamiento *in situ* con Boc_2O ²⁰¹ (Esquema 12), un método muy utilizado en síntesis de péptidos y productos naturales que en general conduce a mejores rendimientos que si se hace la desprotección/protección en reacciones independientes.²⁰² Tras la elaboración habitual se aisló el carbamato de *tert*-butilo **25** (77% de rendimiento) que, finalmente, por ruptura de sus éteres silílicos con TBAF 1M en THF,²⁰³ permitió obtener **22** (88% de rendimiento).

Alternativamente el compuesto **22** se preparó aplicando directamente sobre **15** el mismo procedimiento de *N*-desbencilación y posterior formación del carbamato de *tert*-butilo. Para ello sobre una disolución de **15** en AcOEt seco y bajo atmósfera de hidrógeno en presencia de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20% y Boc_2O se obtuvo **22** con un rendimiento del 96% (Esquema 12).



Esquema 12

²⁰² (a) Sardina, F. J.; Howard, M. H.; Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4654. (b) Parsons, P. J.; Camp, N. P.; Underwood, J. M.; Harvey, D. M. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 11637.

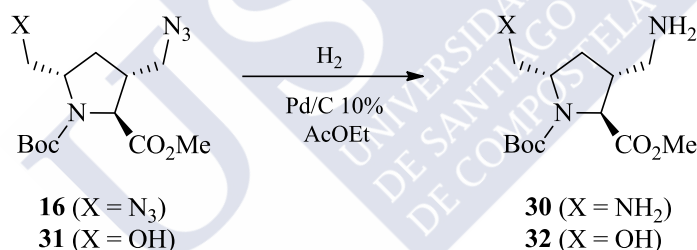
²⁰³ García, M. D.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Pérez-Castro, I. *Synthesis* **2006**, 3967.

2.1.2.4.5. Reducción de azidas. Síntesis de los aminometilésteres **30** y **32**

Las azidas pueden reducirse con facilidad en un proceso de *N*-dihidrodesdiazobisustitución a las correspondientes aminas primarias. Una variada y gran cantidad de sistemas reductores pueden ser utilizados con este fin;^{204,205} entre ellos se incluyen hidruros metálicos complejos como el LiAlH₄ o NaBH₄, la hidrogenación catalítica, el Mg o Ca en MeOH,²⁰⁶ la asociación NH₂NH₂-Pd,²⁰⁷ o fosfinas trisustituidas como la Ph₃P o Me₃P entre otras (reacción de Staudinger).²⁰⁸ Este último método resulta especialmente útil al permitir la reducción de la azida en condiciones suaves y con total selectividad.

Además, otros reactivos como Zn-NH₄Cl,²⁰⁹ o HI,²¹⁰ más frecuentemente empleados como sistemas reductores del grupo nitro, también han sido propuestos como buenos reductores para el grupo azida.^{211,212}

Para la síntesis del compuesto **30** (Esquema 13) se ensayó en primer lugar la reducción de Staudinger,^{166b} empleando Ph₃P en THF/H₂O. Aunque con el progreso del tiempo de reacción se observó la desaparición del compuesto **16** (CCF), una vez elaborada la masa de reacción no fue posible aislar el diamino éster **30** de la mezcla compleja de productos obtenida.



Esquema 13

Ante estos resultados y al no existir en la molécula ningún grupo sensible a las condiciones de hidrogenación catalítica, se recurrió a este método. Para ello el compuesto **16** se disolvió en AcOEt seco y se agitó con Pd/C 10% en atmósfera de H₂ durante 4 h, obteniéndose **30** con un rendimiento prácticamente cuantitativo (96%).

Ante estos resultados se aplicaron similares condiciones al azidohidroxiéster **31**, obteniéndose el correspondiente aminohidroxiéster **32**, (Esquema 13) con un rendimiento del 70%.

²⁰⁴ March, J. *Advanced Organic Chemistry*, 4th ed. John Wiley & Sons, New York, **1992**, p. 1219.

²⁰⁵ (a) Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. *Chem. Rev.* **1988**, 88, 297. (b) Rolla, F. J. *Org. Chem.* **1982**, 47, 4327.

²⁰⁶ Maiti, S. N.; Spevak, P.; Reddy, A. V. N. *Synth. Commun.* **1988**, 18, 1201.

²⁰⁷ Malik, A. A.; Preston, S. B.; Archibald, T. G.; Cohen, M. P.; Baum, K. *Synthesis* **1989**, 450.

²⁰⁸ Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635.

²⁰⁹ Bartra, B.; Romea, P.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron* **1990**, 46, 587.

²¹⁰ Krasnec, L. Z. *Chem.* **1971**, 11, 110.

²¹¹ Lin, W.; Zang, X.; He, Z.; Jin, Y.; Gong, L.; Mi, A. *J Synth. Commun.* **2002**, 32, 3285.

²¹² Kamal, A.; Reddy, P. S. M. M.; Reddy, D. R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 6629.

^{166b} García, M. D.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Abeijon, P.; Blanco, J. M. *Synthesis* **2006**, 73.

2.1.2.5. Sustitución nucleófila sobre derivados activados de grupos hidroxilo

La activación de un grupo hidroxilo en forma de tosilato²¹³ o mesilato²¹⁴ es un método muy empleado para conseguir su sustitución por diversos nucleófilos. Estos sulfonatos son fácilmente preparados a partir de los cloruros de sulfonilo correspondientes en presencia de una base, como la piridina u otra amina.

2.1.2.5.1. Síntesis de los alquilsulfonatos **33–35**, **38** y **39b**

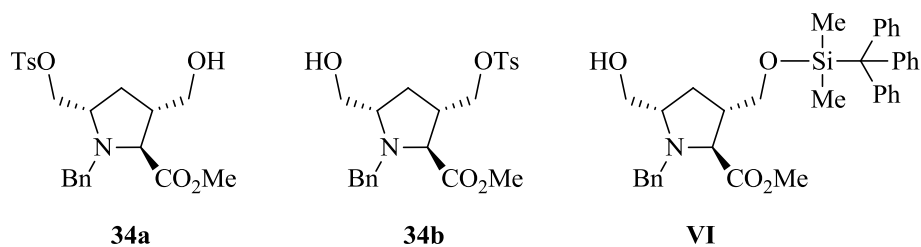
En un primer ensayo el derivado dihidroxilado **15**, se trató con cloruro de tosilo en una proporción de 1/1,6 con el objetivo de obtener los tres posibles derivados tosilados, es decir, el derivado ditosilado **33** y los dos derivados monotosilados, **34a** y **34b**; la purificación cromatográfica del residuo obtenido, tras la elaboración habitual de la masa de reacción, condujo a **33** (22%) y a uno de los derivados monotosilados, **34a** o **34b** (9%). En un segundo ensayo, en el que la proporción de cloruro de tosilo se elevó a 3 moles por mol de diol **15**, el resultado fue todavía peor (**33**, 12%).

Los datos de RMN del derivado monotosilado **34** no nos han permitido asignar con seguridad el grupo hidroximetilo sobre el que tiene lugar la formación del sulfonato de *p*-metilbenceno. Sin embargo, el menor impedimento estérico alrededor del grupo hidroximetilo de la posición 3 del anillo de la pirrolidina, favorece que el derivado monotosilado se forme en dicha posición. Además, un trabajo anteriormente realizado en nuestro grupo de investigación²¹⁵ apoya esta asignación, ya que cuando se intentó proteger selectivamente uno de los grupos hidroxilo de **15** con cloruro de *tert*-butildifenilsililo se obtuvo mayoritariamente el compuesto **VI**, cuya estructura fue inequívocamente establecida mediante el análisis de rayos X de un monocristal de un derivado sólido del mismo (3,5-dinitrobenzoato). En base a ello proponemos como estructura más probable para el derivado monotosilado la correspondiente a **34b**. Esta hipótesis se vio refrendada a lo largo del desarrollo de este trabajo, con otros análisis de rayos X de compuestos preparados a partir de estructuras análogas portadoras del grupo Boc sobre el nitrógeno de la pirrolidina.

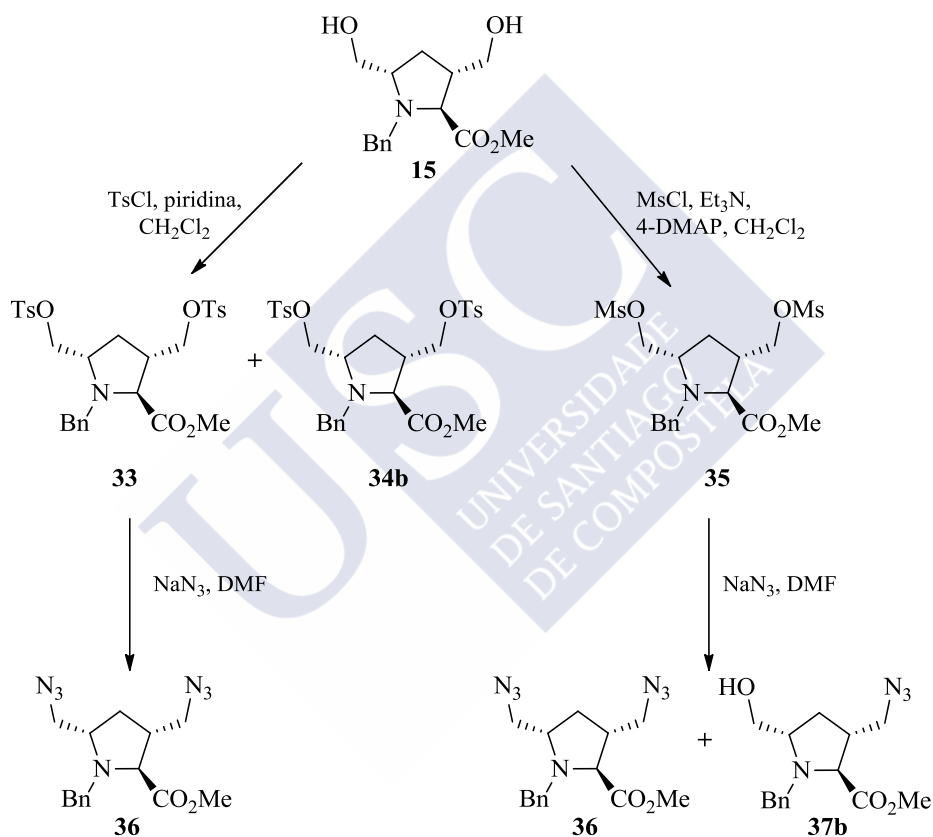
²¹³ Tino, J. A.; Clark, J. M.; Field, A. K.; Jacobs, G. A.; Lis, K. A.; Michalik, T. L.; McGeever-Rubin, B.; Slusarchyk, W. A.; Spergel, S. H.; Sundeen, J. E.; Tuamari, A. V.; Weaver, E. R.; Young, M. G.; Zahler, R. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1221.

²¹⁴ Hossain, N.; Blaton, N.; Peeters, O.; Rozenski, J.; Herdewijn, P. A. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5563.

²¹⁵ Tese de Seminario de Teresa Santos. *Síntese de Isozanucleósidos com Potencial Actividade Antivírica e Antineoplásica*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, **2004**.



La preparación del derivado dimesilado **35** se consiguió con mejor rendimiento (64%), aunque no todo lo bueno que cabría esperar (Esquema 14).



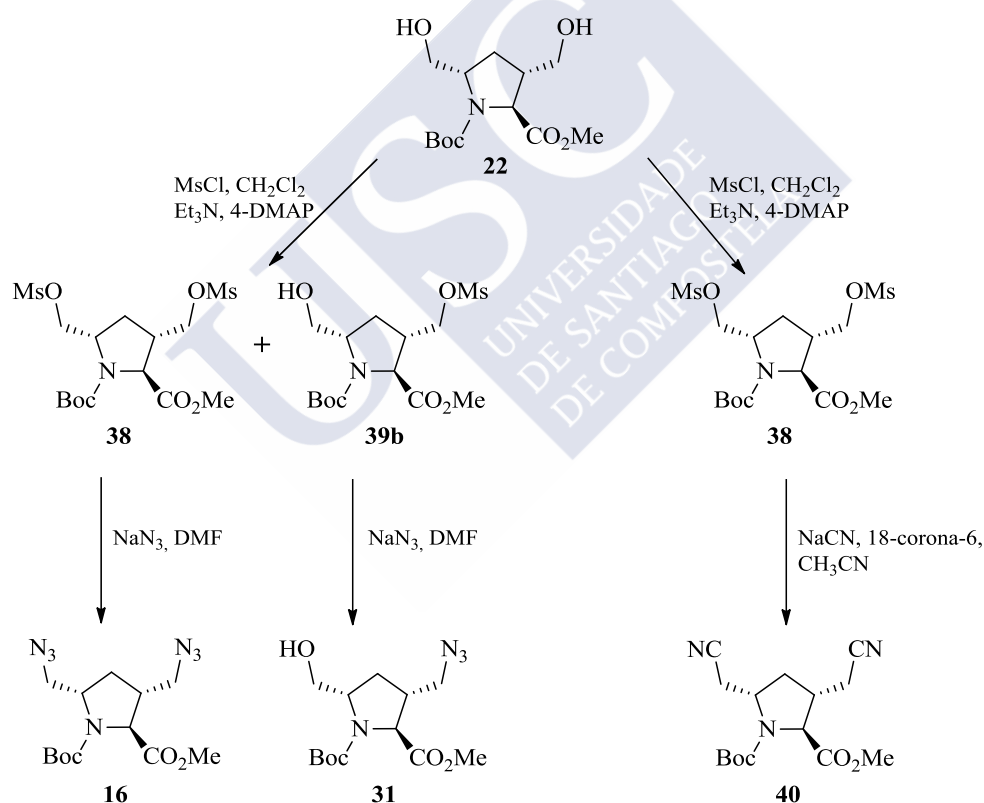
Esquema 14

Una breve revisión bibliográfica referente a diversas transformaciones químicas realizadas sobre distintos derivados de prolina indica que la mayoría de estos compuestos presentan una característica común: su grupo amino se encuentra sustituido por grupos atractores de electrones, con mayor frecuencia, por un grupo acilo y muy mayoritariamente ese grupo es el *terc*-butoxicarbonilo (Boc).

Cabe esperar que un grupo atractor de electrones sobre el nitrógeno de la pirrolidina incremente la reactividad de los grupos hidroximetilo de las posiciones 3 y 5 del anillo de pirrolidina, además la introducción de un grupo Boc en el anillo de pirrolidina puede causar otros efectos, como

cambios en la geometría del anillo y en la orientación de los sustituyentes de las posiciones 3 y 5, debido tanto a la minimización de la tensión pseudoalilica 1–3, como a diferentes propiedades de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

Estas observaciones, unidas a nuestro interés en incrementar los rendimientos en otros derivados activados del diol **22**, que constituyesen alternativas como precursores inmediatos de los compuestos prolina-miméticos objetivo de este trabajo y en lo posible fuesen más fáciles de aislar (en general las reacciones anteriormente descritas daban lugar a mezclas de compuestos difíciles de separar), nos animó a explorar la posibilidad de sintetizar los compuestos análogos a los anteriores en los que el grupo protector bencilo de la amina de la pirrolidina, fuese sustituido por el grupo Boc. Esto, además nos permitiría comparar la reactividad entre los compuestos protegidos con uno y otro grupo.



Para la formación del derivado dimesilado **38** (Esquema 15), se empleó una proporción de compuesto **22**/MsCl: 1/3, alcanzándose un rendimiento del 96%, muy superior al conseguido en el caso del compuesto análogo **35** (64%) en el que el grupo protector era el bencilo. En un ensayo en el que se disminuyó la proporción **22**/MsCl (1/2), se obtuvo la mezcla de **38** (72%) y **39b** (25%).

2.1.2.5.2. Síntesis de compuestos prolina-miméticos portadores de grupos azido y ciano, **16**, **31**, **36**, **37b** y **40**

Se realizaron diversos ensayos para la preparación de la diazidaéster **36**. Para ello **33** y/o **35** se trataron con exceso de azida sódica en DMF,^{166b} (Esquema 14), aislándose **36** con unos rendimientos que se pueden calificar de pobres a moderados, siendo el mejor del 54% a partir de **33** y en las condiciones de reacción más favorables. Cuando se empleó **35** como material de partida además de **36** (41%), se formó el 3-azido-5-hidroxi derivado **37b** con un rendimiento del 13%.

Otros intentos de procesos de sustitución nucleófila sobre **33** y **35** empleando diisopropilamina²¹⁶ o cianuro potásico (KCN)²¹⁷ resultaron infructuosos.

Sobre los derivados mesilados **38** y **39b** se ensayaron sustituciones nucleófilas similares a las previamente realizadas sobre los compuestos análogos **33** y **35**. Así, el tratamiento de **38** (Esquema 15) con NaN₃ proporcionó la diazidaéster **16** con un rendimiento del 80% y la reacción de **39b** en las mismas condiciones condujo a la monoazida **31** (88%).

Cuando **38** se hizo reaccionar, en condiciones similares a las ensayadas sin éxito sobre **33** y **35**, para la formación del correspondiente carbonitrilo (NaCN, 18-corona-6 y acetonitrilo seco), se obtuvo el di(cianometil)éster **40** con un rendimiento del 61%. La estructura del mismo fue determinada inequívocamente mediante el análisis de rayos X de un monocristal (Figura 18).²¹⁸ Este dato confirma también la configuración relativa del compuesto clave **38** y consecuentemente de la serie completa de derivados preparados a partir del mismo (Esquema 15).

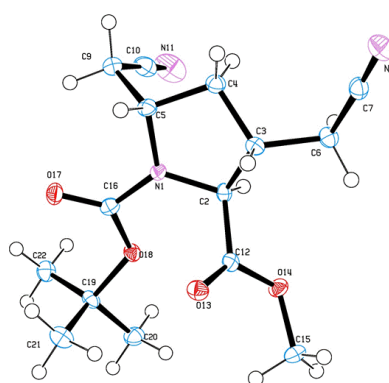


Figura 18. Diagrama ORTEP del compuesto **40**.

^{166b} García, M. D.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Abeijon, P.; Blanco, J. M. *Synthesis* **2006**, 73.

²¹⁶ Mandl, C. P.; König, B. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 670.

²¹⁷ Malpass, J. R.; Patel, A. B.; Davies, J. W.; Fulford, S. Y. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 9348.

²¹⁸ Los datos cristalográficos del compuesto **40** han sido depositados en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge como publicación privada CCDC 779237. Copias de estos datos pueden obtenerse libres de cargo en la aplicación del CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.

Se intentó también la formación del 3,5-bis(metoximetil) derivado **41** por tratamiento de **38** con KOH en metanol.²¹⁹ La elaboración de la reacción condujo a una mezcla compleja de sustancias de difícil separación, indicativo de que el medio básico empleado no resulta compatible con la estabilidad del compuesto de partida.

2.1.2.5.3 Éteres a partir de alcoholes: Reacción de Williamson. Síntesis de compuestos prolina-miméticos portadores de grupos éter, **41–43**

Descubierta en 1850, la síntesis de Williamson es uno de los mejores métodos para preparar éteres, tanto simétricos como asimétricos. El proceso consiste en la reacción de alcóxidos metálicos con halogenuros y tosilatos primarios mediante un mecanismo de sustitución nucleófila (S_N2).

Los alcóxidos necesarios en la reacción de Williamson se preparan normalmente por reacción de un alcohol con una base fuerte, como el hidruro sódico, generándose la sal sódica del alcohol. Una variante de la síntesis de Williamson emplea el óxido de plata Ag_2O como base. En estas condiciones el alcohol libre reacciona directamente con el halogenuro de alquilo de modo que no se precisa la previa formación del alcóxido metálico intermediario.

Aplicando esta última metodología se obtuvieron los metoxiderivados **41** (46%) y **42b** (38%) por reacción del diol **22** en acetonitrilo y Ag_2O con un gran exceso de CH_3I (**22**/ CH_3I , 1:20),²²⁰ durante 54 h (Esquema 16). Tiempos de reacción más prolongados (hasta 126 h) y un mayor exceso de CH_3I , (**22**/ CH_3I , 1:140), no mejoran el rendimiento en el diéter **41**, sino que por el contrario, se invierte la proporción de compuestos formados, **41/42b** (31/58%).

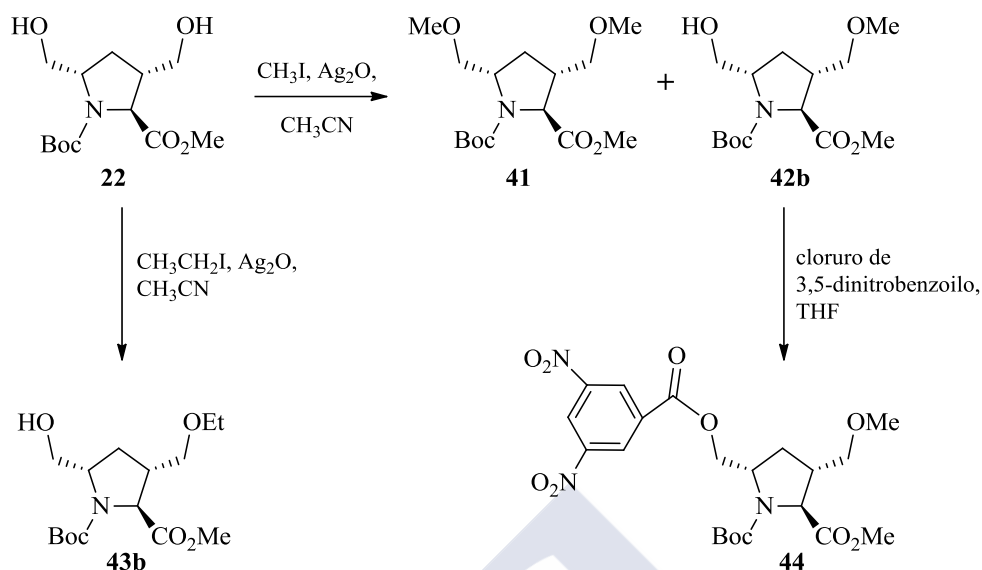
Utilizando el mismo procedimiento empleando yoduro de etilo, se obtuvo el monoéter etílico **43b** (37%) tras 115 h de reacción, recuperándose además aproximadamente la mitad del material de partida inalterado.

Finalmente a partir de **42b**, se preparó el 3,5-nitrobenzoato **44**^{169b} con un rendimiento del 46%.

²¹⁹ Ng, E. W.; Aung, M. M.; Abood, M. E.; Martin, B. R.; Razdan, R. K. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1975.

²²⁰ Finch, N.; Fitt, J. J.; Hsu, I. H. S. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 206.

^{169b} Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron-Asymm.* **2000**, *11*, 4805.



Esquema 16

2.1.2.6. Preparación de estructuras triazólicas

2.1.2.6.1. Síntesis de triazoles

En los últimos años los compuestos triazólicos han recibido mucha atención debido a su amplia gama de aplicaciones en química orgánica y en química médica. Muchos compuestos pertenecientes a la familia de los 1,2,3-triazoles muestran propiedades biológicas de interés, tales como antialérgicas,²²¹ antibacterianas,²²² anti-HIV,²²³ antiinflamatorias, hipoglicemiantes, antidepresivas, antituberculosas, analgésicas, antimaláricas y anticancerígenas. Además un importante grupo de compuestos que poseen estos anillos, han encontrado aplicaciones en química agrícola como herbicidas, fungicidas y colorantes.²²⁴

²²¹ (a) Buckle, D. R.; Rockell, C. J. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 627. (b) Buckle, D. R.; Outred, D. J.; Rockell, C. J. M.; Smith, H.; Spicer, B. A. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 251. (c) Buckle, D. R.; Rockell, C. J. M.; Smith, H.; Spicer, B. A. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 2262.

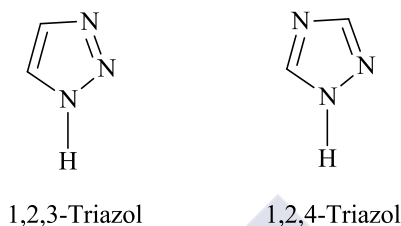
²²² Genin, M. J.; Allwinw, D. A.; Anderson, D. J.; Barbachyn, M. R.; Emmert, D. E.; Garmon, S. A.; Graber, D. R., Grega, K. C.; Hester, J. B.; Hutchinson, D. K.; Morris, J.; Reischer, R. J.; Ford, C. W.; Zurenco, G. E.; Hamel, J. C.; Schaadt, R. D., Stapert, D.; Yagi, B. H. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 953.

²²³ Alvarez, R.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Perno, C. F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 4185.

²²⁴ Wahmhoff, H. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Katritzky, A. R., Rees, C. W., Eds., Pergamon, Oxford, **1984**, vol. 5.

El principal método de obtención de 1,2,3-triazoles es la reacción de cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen²²⁵ entre azidas y alquinos terminales, siendo también una de las reacciones más destacadas de la química clic.

El termino triazol se refiere a un par de moléculas isómeras, constituidas por un anillo de dos átomos de carbono y tres átomos de nitrógeno. Los dos isómeros posibles son:



2.1.2.6.2. Química clic

Para la existencia de la vida es fundamental la construcción de enlaces carbono-carbono en medio acuoso mediante procesos de condensación de tipo aldólico. Con CO₂ como fuente de carbono y un número limitado de reacciones, la naturaleza proporciona una enorme diversidad estructural y funcional. Como las reacciones biosintéticas requieren una enzima única para cada proceso, condición que en las síntesis realizadas en el laboratorio resulta impracticable, la química orgánica basada en la formación de enlaces C-C es poco adecuada para un rápido descubrimiento de moléculas con propiedades interesantes.

En los metabolitos primarios, la naturaleza crea enlaces C-heteroátomo para codificar y expresar la información genética. Los polinucleótidos, polipéptidos y polisacáridos son los tres tipos principales de moléculas que intervienen en los procesos biológicos y, para su biosíntesis, los organismos vivos construyen oligómeros a expensas de bloques pequeños, lo que permite acceder a una gran diversidad estructural partiendo de menos de 40 monómeros que contienen como máximo seis enlaces C-C contiguos, a excepción de tres aminoácidos aromáticos que tienen más. La capacidad de la naturaleza para crear y controlar toda esta diversidad depende mucho de los sistemas enzimáticos que emplea.

En la síntesis orgánica los catalizadores son mucho menos sofisticados, particularmente en el caso de las reacciones que dan lugar a enlaces C-C, y si se plantea una síntesis que requiera la construcción de enlaces C-C que no estén presentes o al menos latentes en los materiales de partida, van a surgir problemas, en especial si la síntesis se tiene que realizar con más de un sustrato (por

²²⁵ Huisgen, R. *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Padwa, A. Ed., Wiley, New York, **1984**, p. 1.

ejemplo en química combinatoria) o a gran escala. Los problemas serán menores si sólo es necesario unir, funcionalizar y/o reorganizar los compuestos de partida sin precisar la construcción de nuevos enlaces C-C, y si éstos son necesarios, es mejor construirlos intramolecularmente.

Barry Sharpless definió la "química clic"²²⁶ teniendo en cuenta el cálculo de Guida y col.,²²⁷ según el cual el número de candidatos que razonablemente podrían llegar a fármacos es del orden de entre 10^{62} y 10^{63} entidades moleculares (compuestos con 30 o menos átomos distintos de hidrógeno y peso inferior a 500 daltons, conteniendo sólo H, C, N, O, P, S, F, Cl y/o Br, y preferentemente estables a temperatura ambiente en presencia de aire y agua). En la actualidad sólo se conocen del orden de entre 10^6 y 10^7 moléculas de este tipo, es decir, una parte infinitesimal de las moléculas potencialmente útiles con fines terapéuticos. Por esta razón es importante no olvidar que *el objetivo último de la síntesis es la producción de propiedades y no de compuestos* y que, por lo tanto, *la búsqueda debería restringirse a moléculas fáciles de preparar*. Para ello se definieron una serie de reglas a seguir en la química clic:

Las rutas sintéticas han de ser cortas y las reacciones reproducibles, estereoespecíficas y sencillas, con formación preferente de enlaces carbono-heteroátomo y evitando la formación de enlaces C-C mediante condensaciones de tipo aldólico, por resultar éstas más costosas desde un punto de vista energético y conducir generalmente a un mayor número de productos secundarios.

Los materiales de partida serán asequibles y, tanto éstos como los compuestos preparados, estables en presencia de agua y aire; las reacciones podrán realizarse sin disolventes o con disolventes fáciles de manejar y los rendimientos deberán ser altos y reproducibles, obteniéndose compuestos fácilmente aislables y separables de los secundarios mediante métodos preferentemente no cromatográficos, como la destilación o la cristalización.

Además, la química clic proporciona mayor diversidad a partir de menos reacciones, ya que no es tan importante el número de éstas como su tolerancia en la variabilidad de sus componentes.²²⁸

La formación de enlaces carbono-heteroátomo buscada podrá obtenerse mediante cicloadición de especies insaturadas, como la cicloadición 1,3-dipolar²²⁵ o reacciones tipo Diels-Alder;^{229,230} reacciones de apertura nucleófila de anillos (especialmente de heterociclos electrófilos tensionados

²²⁶ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004.

²²⁷ Bohacek, R. S.; McMartin, C.; Guida, W. C. *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 3.

²²⁸ Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128.

²²⁵ Huisgen, R. *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Padwa, A. Ed., Wiley, New York, **1984**, p. 1.

²²⁹ Jorgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3558.

²³⁰ Tietze, L. F.; Ketschau, G. *Top. Curr. Chem.* **1997**, *189*, 1.

como epóxidos, aziridinas, sulfatos cíclicos, sulfamidatos cíclicos, iones aziridinio y episulfonio),²²⁶ química del carbono de tipo no aldólico (formación de ureas, tioureas, heterociclos aromáticos, oximas, hidrazonas o amidas), o adiciones a enlaces C-C múltiples, en especial de tipo oxidativo como epoxidación,²³¹ dihidroxilación,²³² aziridinación²³³ o adición de haluros de sulfenilo²³⁴ e incluso adiciones de Michael.

La química clic no es por lo tanto un nuevo tipo de síntesis orgánica sino una nueva filosofía aplicada a la síntesis orgánica tradicional, a la que complementa y simplifica. Su objetivo es acelerar el descubrimiento de sustancias útiles teniendo en cuenta los procesos naturales pero sin intentar imitarlos fielmente. Dado el alto contenido energético del enlace π olefínico, las reacciones orgánicas mejores y más útiles implican olefinas o sus productos de adición oxidativa. La síntesis a partir de hidrocarburos insaturados es una de las bases de la química clic puesto que estos materiales son fáciles de obtener de la naturaleza o de la industria petroquímica, y los productos son o se pueden transformar fácilmente en los bloques ideales para el ensamblaje rápido e irreversible de moléculas con potenciales características de fármaco.

La química clic funciona bien en colaboración con la química combinatoria y con los estudios de relaciones estructura-actividad y, mediante la elección de unidades apropiadas, puede proporcionar estructuras miméticas o derivadas de los farmacóforos “tradicionales”, fármacos y/o productos naturales, aunque lo mejor es su capacidad para generar nuevas estructuras que no necesariamente tienen que parecerse a farmacóforos conocidos.

Las áreas en las que la química clic está teniendo mayor impacto son la bioconjugación, la ciencia de materiales y el desarrollo de fármacos.²³⁵ En este último campo cabe destacar la síntesis de quimiotecas mediante química combinatoria, la química clic *in situ* y el descubrimiento de fármacos basado en la formación de triazoles a partir de azidas y alquinos catalizada por Cu(I), en los cuales el grupo triazol ya no sólo cumple la función de enlace sino que constituye una parte clave del farmacóforo.²³⁶

²²⁶ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004.

²³¹ Adolfsson, H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3991.

²³² Kolb, H. C. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2483.

²³³ Gontcharov, A. V. *Org. Lett.* **1999**, 1, 783.

²³⁴ Kühle, E. *Synthesis* **1970**, 11, 563.

²³⁵ Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1249.

²³⁶ Moorhouse, A. D.; Santos, A. M.; Gunaratnam, M.; Moore, M.; Neidle, S.; Moses, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15972.

2.1.2.6.3. Reacción de adición 1,3-dipolar de Huisgen

La reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen de alquinos terminales con azidas para dar triazoles²³⁷ (Esquema 17) resulta de gran utilidad debido a la facilidad con que se puede disponer de moléculas con grupos azida y enlaces C≡C, así como a su estabilidad bajo diversas condiciones ambientales (presencia de oxígeno o agua) y de la mayoría de las condiciones de reacción más empleadas en síntesis orgánica, lo que la convierte en una reacción biocompatible.²³⁸ Tal estabilidad también es la causa de la lentitud de las cicloadiciones, que además suelen requerir temperaturas elevadas y conducen a mezclas de regioisómeros 1,4- y 1,5-disustituidos en diferentes proporciones dependientes de la naturaleza del alquino, el disolvente empleado y otras condiciones de reacción.



Esquema 17

El descubrimiento simultáneo por parte de los grupos de Sharpless²³⁹ y Meldal²⁴⁰ de que la catálisis por Cu(I) puede acelerar la reacción hasta 10⁷ veces²⁴¹ y además la convierte en regioespecífica proporcionando exclusivamente el triazol 1,4-disustituido, transformó este proceso en el mejor ejemplo de reacción de química clic, ya que es compatible con muy diferentes condiciones de reacción, puede realizarse en una gran variedad de disolventes o mezclas de éstos y/o en presencia de diversos grupos funcionales sin que se precisen grupos protectores, tolera rangos amplios de pH y temperatura y proporciona los triazoles con altos rendimientos sin necesidad de elaboraciones o purificaciones complicadas.

Aunque la cicloadición 1,3-dipolar térmica de azidas y alquinos tiene lugar mediante un mecanismo concertado, estudios cinéticos han manifestado que en presencia de Cu(I), la reacción transcurre por etapas,^{242,243} siendo este proceso energéticamente más favorable.

El mecanismo de reacción propuesto por Sharpless y col.²³⁹ (Esquema 18) comienza con la formación del acetiluro de cobre(I) que posteriormente activa a la azida. La disminución de la densidad electrónica en el alquino conduce a la ciclación del intermedio y a la formación del triazol:

²³⁷ (a) Huisgen, R. *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604. (b) Huisgen, R. *Angew. Chem.* **1963**, 75, 742.

²³⁸ Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5188.

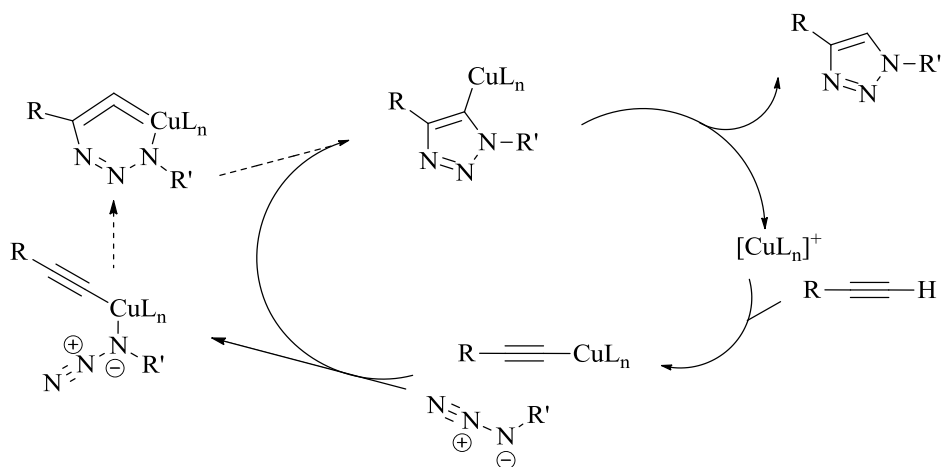
²³⁹ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.

²⁴⁰ Tórnøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.

²⁴¹ Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.* **2004**, 6, 4223.

²⁴² Himo, F.; Novell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210.

²⁴³ Rodinov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2210.



Esquema 18

Como fuente de Cu(I) pueden utilizarse directamente sus sales o prepararse *in situ*, bien mediante oxidación de cobre metal o bien por reducción de sales de Cu(II) con un reductor adecuado (generalmente ascorbato sódico). Inicialmente, el uso directo de Cu(I) se consideró causa de reacciones secundarias dada su extrema sensibilidad a las condiciones de reacción, pero en la práctica se observó que la utilización de bases como diisopropiletilamina (DIEA), 2,6-lutidina o piridina minimizaba la formación de productos secundarios.²⁴⁴ A pesar de los pocos estudios que se han realizado sobre este efecto, parece que el exceso de base (en particular de bases con átomos de N dadoras de electrones como la DIEA) proporciona buenos rendimientos, quizás porque tales bases estabilizan el estado de oxidación del Cu(I), evitando su degradación por oxidación o desproporción, lo que mejora el rendimiento de las reacciones bajo diferentes condiciones.²⁴⁵

2.1.2.6.4. Reacción de adición 1,3-dipolar de Huisgen asistida por microondas

El primer dispositivo generador de radiación por microondas llamado magnetrón fue creado por Randall y Booth en la Universidad de Birmingham durante la segunda Guerra Mundial. Investigaciones posteriores demostraron que las microondas podían incrementar la temperatura interna de los alimentos mucho más rápido que un horno convencional. Todos estos conocimientos llevaron a la producción del primer microondas para uso doméstico en 1954.

A medida que se hicieron mejoras y simplificaciones en el diseño del magnetrón, los precios de los hornos domésticos bajaron significativamente. Como consecuencia, la investigación con microondas a finales del siglo XX fue realizada principalmente en hornos microondas domésticos

²⁴⁴ Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Scout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15366.

²⁴⁵ Bock, V. D.; Hiemstra, H.; Van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.

modificados. La primera publicación en síntesis orgánica fue data 1969, en ella Vanderhoff²⁴⁶ describe el uso del microondas en la polimerización de monómeros de vinilo en disolución acuosa. Sin embargo, las publicaciones más nombradas como punto de partida para la síntesis orgánica asistida por microondas (MAOS) son las realizadas por los grupos de R. Gedye²⁴⁷ y R. J. Giguere²⁴⁸ ambas de 1986.

Inicialmente, en la década de los 80 y a principios de los 90, el desarrollo de la química asistida por microondas fue lento, a causa principalmente de la falta de control y reproducibilidad de los experimentos, a lo que se sumaba la carencia general de conocimientos sobre las bases del calentamiento dieléctrico. Aunque la mayor parte de los experimentos pioneros en MAOS se llevaron a cabo en hornos microondas domésticos, la tendencia actual es a usar instrumentos específicos para síntesis química, con sistemas de seguridad, controladores de presión y temperatura para la monitorización del proceso, que permiten realizar reacciones con disolventes acoplado refrigerantes u otros equipos desde el exterior. El calentamiento por microondas no sólo puede reducir el tiempo de las reacciones químicas de horas a minutos o segundos, sino que también puede reducir reacciones secundarias, aumentar rendimientos y mejorar la reproducibilidad.

Por lo tanto, muchos grupos de investigación tanto académicos como de la industria ya están usando MAOS como una tecnología de vanguardia para la rápida optimización de procesos, para la síntesis eficiente de nuevas sustancias y para el descubrimiento de nuevos aspectos en la reactividad química.²⁴⁹

Espectro electromagnético

En el espectro electromagnético las microondas aparecen en la región entre la radiación infrarroja y la radiación de radiofrecuencias (Figura 19). Las longitudes de onda de las microondas oscilan entre 1 cm y 1m y las frecuencias entre 300 GHz y 300 MHz.

²⁴⁶ Vanderhoff, J. W. (Dow Chemical Co.) US Patent. 3432413A, (1969).

²⁴⁷ Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 279.

²⁴⁸ Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4945.

²⁴⁹ (a) Lidström, P.; Tierney, J. P.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9225. (b) Olofsson, K.; Larhed, M. *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Lidström, P.; Tierney, J. P. Eds., Blackwell, Oxford, **2004**. (c) Loupy, A. *Microwaves in Organic Synthesis*, Loupy, A. Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, vol. 1-2.

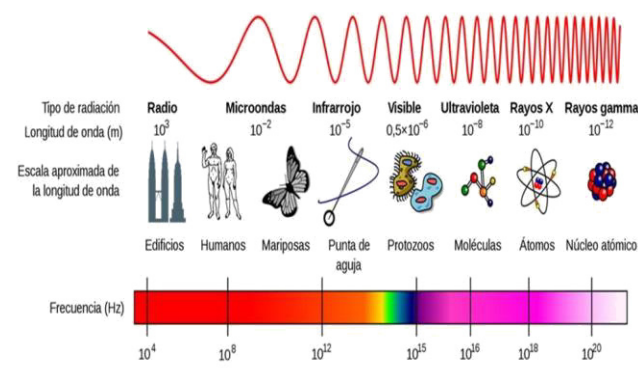


Figura 19. Espectro electromagnético.

Los hornos microondas y los sistemas de laboratorio generalmente trabajan a 2,45 GHz.

Calentamiento por microondas

Los sistemas de calentamiento convencionales suelen ser métodos de transferencia de energía lentos e ineficaces, ya que dependen de las corrientes de convección y de la conductividad térmica de los materiales que deben penetrar, lo que provoca que la temperatura del tubo de reacción sea mayor que la de la mezcla de la reacción (Figura 20). Además, el gradiente de temperaturas puede llevar a una descomposición de reactivos y/o productos. En cambio, el calentamiento por irradiación con microondas se produce por acoplamiento de las microondas con las moléculas del disolvente, reactivos o catalizadores presentes en la mezcla de reacción. Los recipientes empleados son transparentes a las microondas, por lo que la radiación pasa a través de las paredes directamente a todo el volumen de la reacción, lo que provoca un gradiente de temperaturas inverso con respecto al calentamiento convencional.

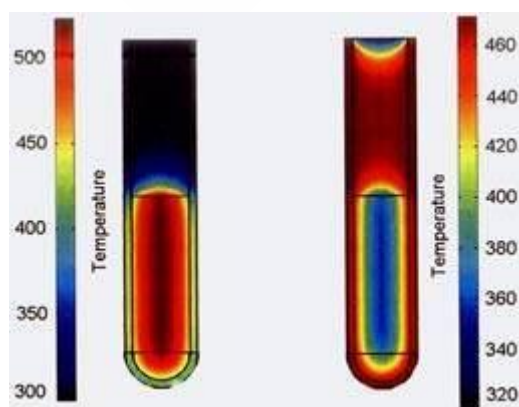


Figura 20. Perfil de temperaturas en un proceso de calentamiento microondas y convencional.

El calentamiento por microondas también denominado calentamiento dieléctrico, es un fenómeno que depende de la capacidad de un material específico (disolvente o reactivo) para absorber

energía microonda y convertirla en calor. La componente eléctrica del campo electromagnético provoca el calentamiento fundamentalmente por dos mecanismos:²⁵⁰

- *Interacción de dipolo* (polarización dipolar o rotación de dipolo). La irradiación de la muestra con radiación microonda provoca el alineamiento de los dipolos en el campo eléctrico aplicado. Como este oscila, el campo de los dipolos tiende a realinearse con el campo eléctrico oscilante y en el proceso, a través de la fricción y de la pérdida dieléctrica, se produce calor. Tanto si el dipolo no tiene tiempo suficiente para realinearse, o si se reorienta demasiado rápido con el campo aplicado, no tiene lugar el calentamiento (Figura 21).

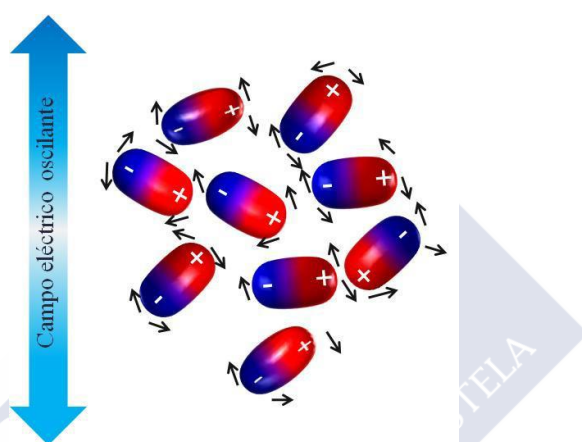


Figura 21. Mecanismo de calentamiento con microondas por interacción de dipolos.

- *Conducción iónica*, el calor se genera mediante pérdidas por fricción, que tienen lugar a través de la migración de los iones disueltos cuando se someten a la acción de un campo electromagnético (Figura 22). Estas pérdidas dependen del tamaño, carga, conductividad de los iones disueltos y de la interacción de estos últimos con el disolvente.

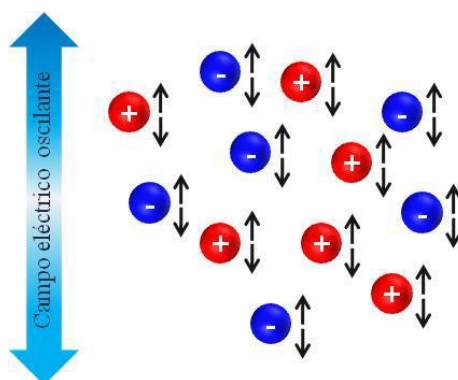


Figura 22. Mecanismo de calentamiento con microondas por conducción iónica.

²⁵⁰ Tesis Doctoral de José Crecente Campo. *Síntesis Orgánica Asistida por Microondas. Obtención de Enolcarbamatos, Tetraisoquinolinas, Benzoazepinas, Tiazolinas, Sulfuros de Fosfoles, Isoflavonas, Arilcumarinas, Cumarinocumarinas, y Núcleos de Dendrimeros. Aplicaciones.* Universidade Santiago de Compostela, **2009**.

El efecto microondas

Desde los comienzos de la síntesis con microondas, los incrementos en la velocidad de reacción observados y a veces, la distinta distribución de productos obtenidos comparada con los experimentos calentados mediante un baño de aceite, llevaron especular con la existencia del llamado *efecto microondas específico*, o no-térmico.^{251,252} Históricamente, tales efectos fueron propuestos cuando el resultado de una reacción por microondas era distinto al obtenido con el calentamiento convencional a la misma temperatura. Hoy en día, la mayor parte de los científicos están de acuerdo en que en buena parte de los casos la razón de observar incrementos en las velocidades de reacción se debe a efectos puramente térmicos/cinéticos, como consecuencia de las altas temperaturas de reacción que se alcanzan rápidamente cuando se irradian con microondas sustancias polares.

Además de los efectos térmicos/cinéticos también se deben considerar los efectos provocados por los mecanismos únicos de calentamiento dieléctrico de las microondas. Estos efectos deberían denominarse *efectos microondas específicos* y podrían definirse como aceleraciones que no pueden lograrse o reproducirse con calentamiento convencional, pero que esencialmente son también efectos térmicos.^{253,254}

Algunos autores han sugerido la posibilidad de *efectos microondas no térmicos*, que serían aceleraciones que no pueden explicarse por efectos microondas puramente térmico/cinéticos o el que acabamos de denominar específico. Estos efectos resultan de una interacción directa del campo eléctrico con moléculas específicas en el medio de reacción.²⁵¹

Los efectos microondas son tema de debate y controversia,²⁵⁵ y es evidente que se requieren mayores esfuerzos e investigación para comprender realmente estos fenómenos. Relacionado con el estudio de los efectos microondas está el método reciente de enfriar simultáneamente la mezcla de reacción mientras se calienta con microondas, observando en algunos casos una mejora del proceso global.^{256, 257, 258}

Van der Eycken y col.²⁴¹ utilizaron la química clic asistida por microondas, empleando como catalizador cobre(I), generado *in situ*, por reacción entre Cu(0) y Cu(II), para la síntesis de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos (Esquema 19).

²⁵¹ Perreux, L.; Loupy, A. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9199.

²⁵² Mingos, D. M. P.; Baghurst, D. R. *Chem. Soc. Rev.* **1991**, 20, 1.

²⁵³ Saillard, R.; Poux, M.; Berlan, J.; Audhuy-Peaudecerf, M. *Tetrahedron* **1995**, 51, 4033.

²⁵⁴ Chemat, F.; Esveld, E. *Chem. Eng. Technol.* **2001**, 24, 735.

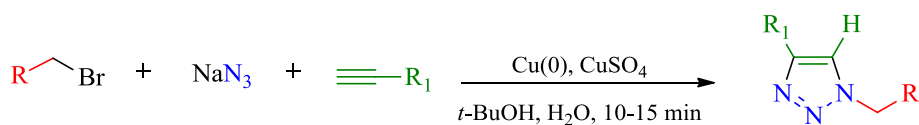
²⁵⁵ Langa, F.; De la Cruz, P.; De la Hoz, A.; Díaz-Ortiz, A.; Díez-Barra, E. *Contemp. Org. Synth.* **1997**, 4, 373.

²⁵⁶ Hayes, B. L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the speed of light*, CEM publishing, Matthews NC, **2002**.

²⁵⁷ Chen, J. J.; Deshpande, S. V. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 8873.

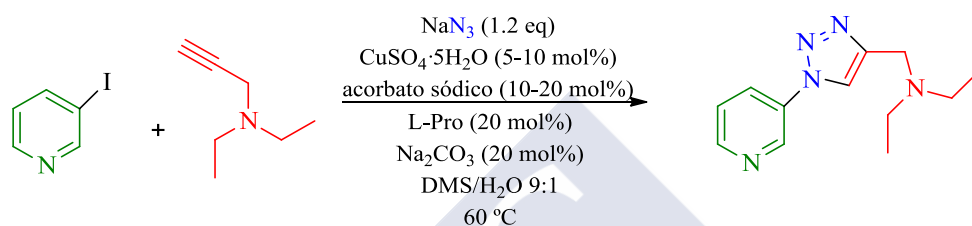
²⁵⁸ Mathew, F.; Jayaprakash, K. N.; Fraser-Reid, B.; Mathew, J.; Scicinski, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 9051.

²⁴¹ Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.* **2004**, 6, 4223.



Esquema 19

Folkin y col.²⁵⁹ desarrollaron un método directo para la síntesis de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos a partir de una amplia variedad de halogenuros de arilo y vinilo empleando cobre(I) como catalizador (Esquema 20).



Esquema 20

En la misma línea Castagnolo,²⁶⁰ empleando la reacción de Huisgen asistida por microondas utilizando Cu y ascorbato sódico para generar *in situ* el catalizador cobre(I), preparó 1,2,3-triazoles enantioméricamente puros (que resultaron ser inhibidores de *Mycobacterium tuberculosis*) a partir de propargilamidas y azidas.

2.1.2.6.5. Resultados propios. Síntesis de 3,5-bis[(4-aryl-1,2,3-triazol-4-il)metil] pirrolidina-2-carboxilatos de metilo **45** y **46**

En una primera aproximación a la construcción del sistema triazólico la reacción de **36** y 4-etinilanisol, empleando CuI como fuente de Cu(I), DIEA como base y THF como disolvente,^{261,167,168} condujo a una mezcla compleja de compuestos, imposible de resolver. Sin embargo, cuando se empleó fenilacetileno, CuI, DIEA y como disolvente una mezcla de tolueno/*t*-BuOH,²⁶² se obtuvo el derivado **45** con un rendimiento del 54% (Esquema 21).

Aplicando esta misma metodología sobre la diazidaéster **16**, se aisló el compuesto **46a** (87%), rendimiento muy superior al obtenido en el caso del análogo bencilado **45**. Estas mismas condiciones

²⁵⁹ Feldman, A. K.; Colasson, B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, 6, 3897.

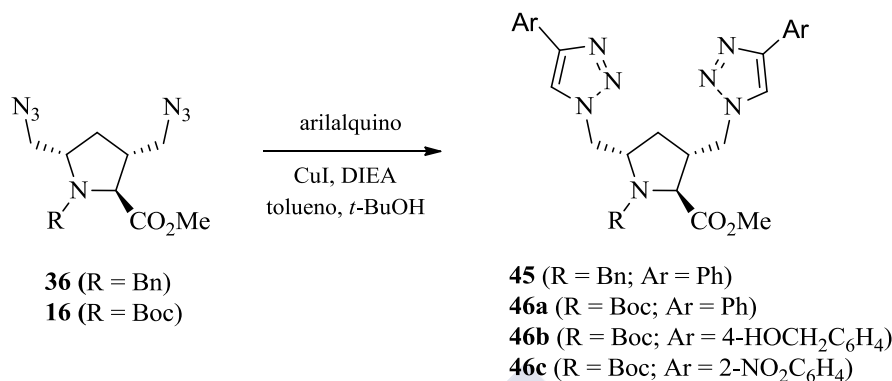
²⁶⁰ Castagnolo, D.; Radi, M.; Dessì, F.; Manetti, F.; Saddi, M.; Meleddu, R.; De Logu, A.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 2203.

¹⁶⁷ Pérez-Castro, I.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García, M. D.; López, C.; De Clercq, E. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 3805.

¹⁶⁸ Pérez-Castro, I.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García, M. D.; López, C.; De Clercq, E. *ARKIVOC* **2010**, 152.

²⁶² Luo, S.; Xu, H.; Mi, X.; Li, J.; Zheng, X.; Cheng, J. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 9244.

se emplearon en las reacciones de **16** con otros dos arilalquinos, (4-etinilfenil)metanol y 1-etinil-2-nitrobenceno, obteniéndose los compuestos **46b** (60%) y **46c** (57%) respectivamente.



Esquema 21

2.1.2.6.6. Resultados propios. Síntesis de 1'-homoisoozanucleósidos **47–54**

Analogamente y por tratamiento del hidroxioazidoéster **31** con fenilacetileno en las condiciones descritas anteriormente se obtuvo el compuesto **47** (70%). La estructura de **47** fue determinada inequívocamente mediante el análisis de rayos X de un monocristal (Figura 23)²⁶³. Este dato confirma también la configuración relativa de su precursor inmediato el hidroxiazido éster **31**, así como del correspondiente derivado monomesilado **39b** y de la serie de compuestos prolina-miméticos diferentemente sustituidos en posiciones 3 y 5 del anillo de prolina preparados a partir del mismo que se describen a continuación. Además, nos permite confirmar las estructuras previamente propuestas (Esquema 16) para los alquil éteres **42b** y **43b**, así como para el 3,5-dinitrobenzoato de **42b**, **44**.

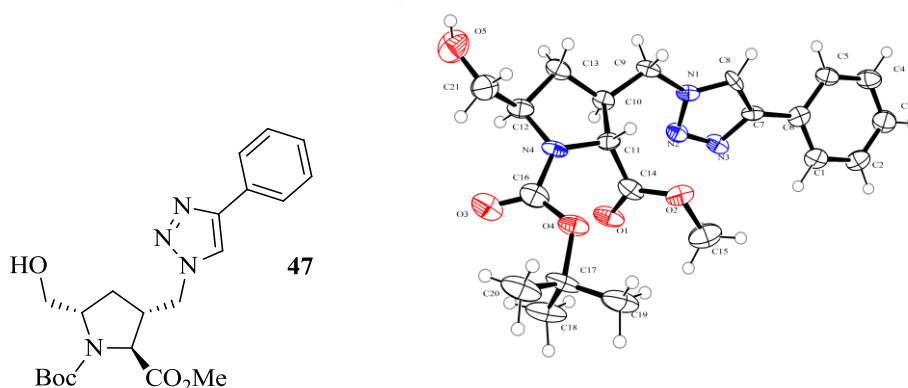


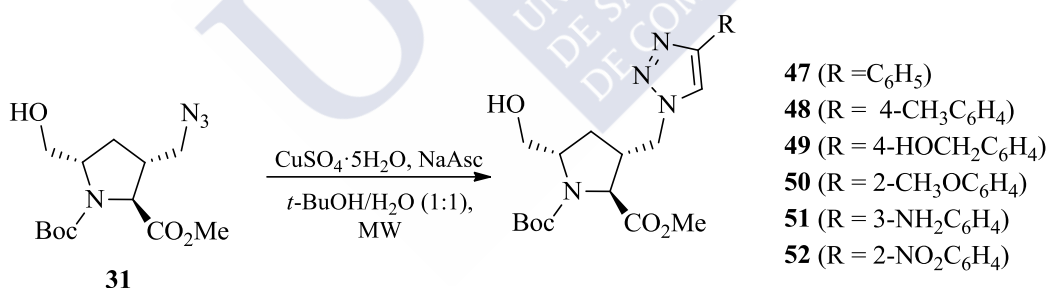
Figura 23. Diagrama ORTEP del compuesto **47**.

²⁶³ Los datos cristalográficos del compuesto **47** han sido depositados en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge como publicación privada CCDC 928715. Copias de estos datos pueden obtenerse libres de cargo en la aplicación del CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.

Los buenos resultados encontrados en la bibliografía para la reacción de Huisgen asistida por microondas, nos llevó a ensayar este proceso. En primer lugar el diazidoéster **16** se hizo reaccionar con fenilacetileno, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fuente de Cu(I), ascorbato sódico y una mezcla de *t*-BuOH/ H_2O como disolvente, a una potencia de 100 W y calentando a 70 °C; en estas condiciones se obtuvo **46a** con un rendimiento del 92%. Comparando este resultado con el de la misma reacción, previamente realizada siguiendo la metodología tradicional de la cicloadición de Huisgen (apartado 2.1.2.6.5), cabe destacar una reducción sustancial del tiempo necesario para el desarrollo de la reacción, pasando de 15 h a 15 min cuando se utiliza el microondas.

Haciendo reaccionar el compuesto **31** con fenilacetileno en idénticas condiciones, se alcanzó un rendimiento del 92% en la formación el compuesto **47**, lo que representa un importante incremento en el rendimiento del proceso de cicloadición frente al método tradicional (70%), y, al igual que en la síntesis de **46a**, se acorta sustancialmente el tiempo de reacción, que pasa de 22 h a 30 min con el uso del microondas.

Las mejoras alcanzadas en la síntesis de **46a** y **47**, junto a la mayor simplicidad experimental del montaje y elaboración de las reacciones ha hecho que la adición 1,3-dipolar de Huisgen asistida por microondas, sea la metodología seguida para la preparación de los 1'-*homo*isozanucleósidos portadores de una base atípica (sistema triazólico) **47–54** (Esquemas 22 y 23).



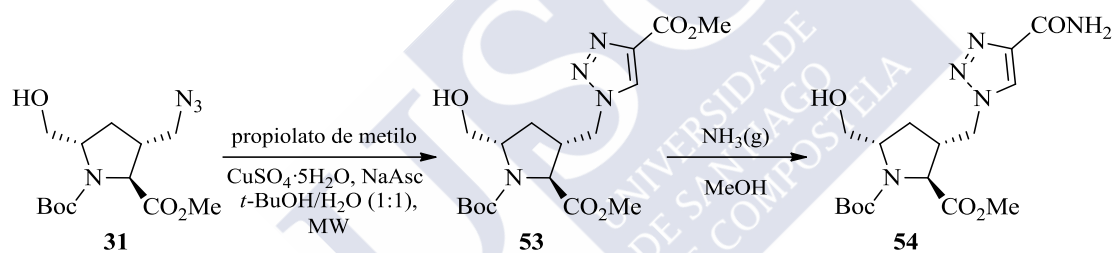
Esquema 22

Tal como se puede ver en la tabla 2, los resultados en general fueron muy buenos. El mejor rendimiento en la preparación de la serie de derivados 4-*aril*-1,2,3-triazoles **47–53**, se obtiene para el compuesto **47** (Tabla 2, entrada 1) y la reacción más rápida, en cuanto a la desaparición del compuesto de partida del medio de reacción, para la síntesis de **49** (Tabla 2, entrada 3). La excepción la constituye la síntesis de **52**, cuyo rendimiento fue bastante más bajo que el de los demás derivados (Tabla 2, entrada 6), esto podría ser debido a que el efecto atractor de electrones del grupo nitro dificulte el proceso de cicloadición.

Tabla 2. Síntesis asistida por microondas de los derivados triazólicos **47–53**

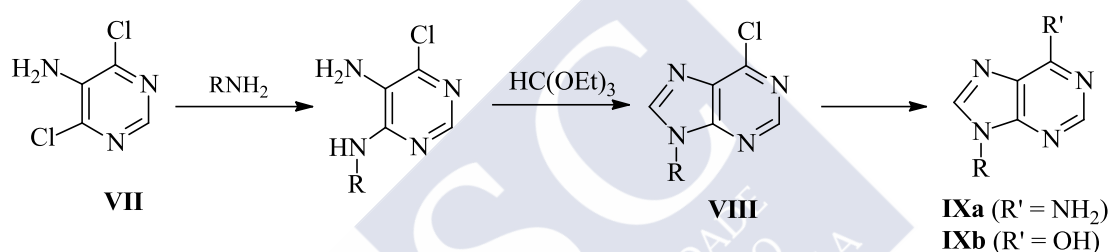
Entrada	R	T (°C)	t (min)	Rendimiento (%)
1	C ₆ H ₅	70	30	47 (92)
2	4-CH ₃ C ₆ H ₄	70	55	48 (76)
3	4-OHCH ₂ C ₆ H ₄	70	10	49 (86)
4	2-CH ₃ OC ₆ H ₄	90	60	50 (73)
5	3-NH ₂ C ₆ H ₄	90	45	51 (84)
6	2-NO ₂ C ₆ H ₄	70	160	52 (38)
7	CO ₂ Me	70	15	53 (94)

Finalmente el derivado **54** (esquema 23) se preparó, con un rendimiento del 87%, por tratamiento de **53** con MeOH saturado de NH₃.



2.1.2.7. Construcción de derivados púricos. 1'-Homoisoozanucleósidos portadores de bases púricas

Las estrategias más utilizadas para obtener análogos nucleosídicos de la adenina partir de amino alcoholes siguen las directrices pioneras de Shealy y Clayton²⁶⁴ (Esquema 24). Esta estrategia consiste en la reacción de una amina cíclica convenientemente funcionalizada con el precursor tipo **VII** y posterior formación del anillo B de la purina mediante el uso de ortoformiato de trietilo en medio ácido, obteniéndose la cloropurina **VIII**, que por sustitución del átomo de cloro en posición 6 del heterociclo rendirá los derivados de adenina **IXa** o hipoxantina **IXb**. El proceso permite obtener no sólo estos derivados sino también establecer otras modificaciones en la posición 6 de la base como 6-alcoxi-, 6-alquiltio, 6-alquilaminopurinas análogas, sin más que tratar el 6-cloroderivado precursor con el correspondiente nucleófilo.



Esquema 24

La construcción de derivados de 6-cloropurina, como ya se ha indicado previamente, consiste en ir construyendo el anillo de purina con los sustituyentes apropiado a partir de un amino alcohol precursor.^{265,266} Este se hace reaccionar, en presencia de trietilamina como aceptor de protones y de 1-butanol como disolvente con 5-amino-4,6-dicloropirimidina, sobre la que se produce el desplazamiento nucleófilo de un átomo de cloro, para dar lugar a la correspondiente diaminocloropirimidina. A continuación se procede a la conversión de esta 5-aminopirimidina en la 6-cloropurina 9-alquilsustituída, formando el anillo pentagonal por reacción con ortoformiato de trietilo en medio fuertemente ácido²⁶⁵ o bien mediante calentamiento a 80-90 °C con acetato de dietoximetilo ($\text{AcOCH}(\text{OEt})_2$),²⁶⁶ que permite unas condiciones de reacción más suaves; el derivado de 6-cloropurina formado tras la ciclación es relativamente estable y puede manipularse con facilidad y según se desee, aislarse²⁶⁶ o utilizarse sin aislar²⁶⁵ en la reacción siguiente.

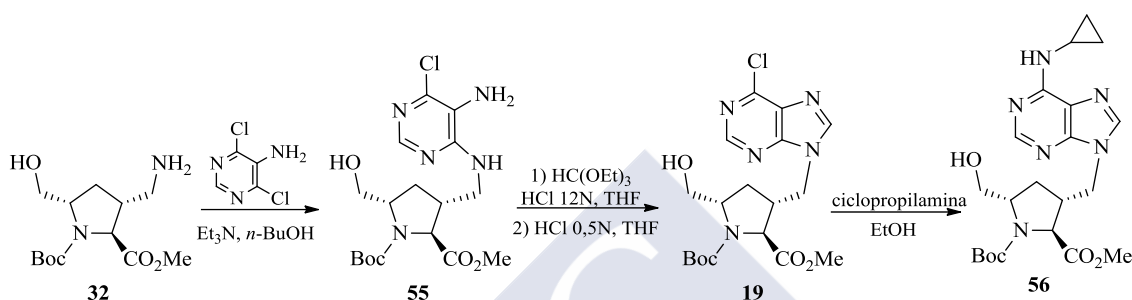
²⁶⁴ Shealy, Y. F.; Clayton, J. D. *J. Pharm. Sci.* **1973**, 62, 858.

²⁶⁵ Daluge, S.; Vince, R. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2311.

²⁶⁶ Patil, S. D.; Scheneller, S. W.; Hosoya, M.; Snoek, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3372.

2.1.2.7.1. Resultados propios

La construcción del derivado de la 6-cloropurina se realizó a partir del aminohidroxi éster, **32**, cuyo tratamiento con 5-amino-4,6-dicloropirimidina condujo al producto de condensación **55** (Esquema 25) con un rendimiento del 76%. Tras hacer reaccionar **55** con ortoformiato de trietilo en las condiciones habituales se pudo aislar, previo fraccionamiento cromatográfico de la mezcla bruta de reacción, la 6-cloropurina esperada **19** con un rendimiento del 53%.



Esquema 25

Entre los procedimientos sintéticos que permiten el desarrollo de derivados púricos 6-sustituídos está el empleo de la *Reacción de Sustitución Nucleófila Aromática* ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$). La sustitución nucleófila sobre la posición 6-halogenada del anillo de purina transcurre mediante un mecanismo de adición-eliminación, produciéndose inicialmente un proceso de adición del nucleófilo sobre el átomo de carbono que soporta el átomo de cloro, a lo que sigue la eliminación del mismo (grupo saliente) en un segundo paso, completándose así la sustitución.²⁶⁷

En nuestro caso la funcionalización de la posición 6 de la purina fue experimentada con un grupo alquilamino, por tratamiento de **19** con *N*-ciclopropilamina en EtOH se obtuvo el *N*-ciclopropilpurinil derivado **56** con un rendimiento del 68%.

²⁶⁷ Bernasconi, C. F. in *MTP Int. Rev. Sci. Organic Series One*, Zollinger, H. Ed., Butterworths, London, **1973**, vol. 3.

2.2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

2.2.1. Principios de la síntesis de péptidos

En el inicio del siglo XX, Curtius²⁶⁸ y Fisher²⁶⁹ independientemente, dieron los primeros pasos en la síntesis química de pequeños péptidos, con la esperanza de sintetizar péptidos y proteínas biológicamente activos. Desde entonces y a lo largo de más de un siglo, la química de la síntesis de péptidos ha constituido un desafío constante.

La metodología aplicada se sustenta fundamentalmente sobre dos aspectos principales:

- en primer lugar, el conocimiento y la elección de grupos protectores selectivos de aminas y ácidos carboxílicos, para diferenciar uno u otro de los grupos a la hora de establecer el enlace peptídico, así como la posterior desprotección selectiva,
- y en segundo lugar, la optimización de las condiciones de formación del enlace peptídico.

Para ello, recientes metodologías de la síntesis de péptidos emplean principalmente dos tipos de procesos, la síntesis tradicional, es decir *síntesis en disolución* y la *síntesis en fase sólida*, aunque ambas se basan fundamentalmente en los mismos principios (Figura 24).²⁷⁰

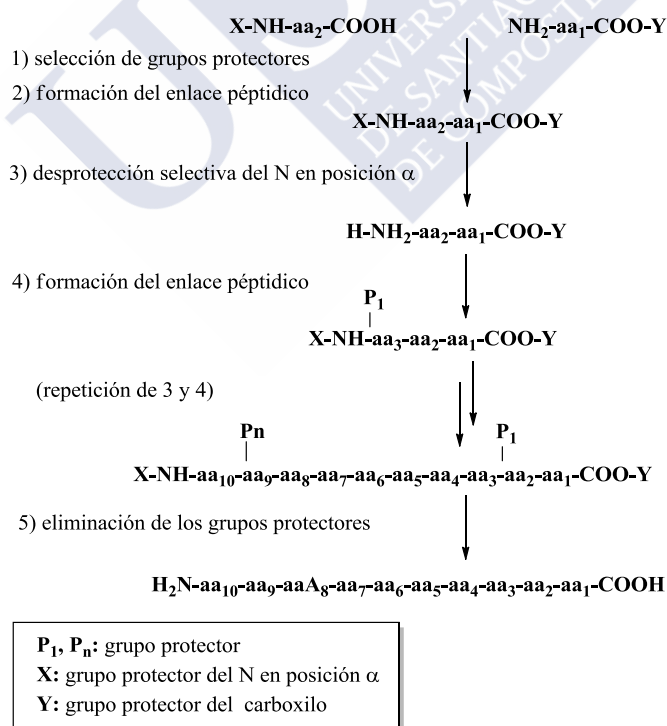


Figura 24. Principios de la síntesis de péptidos.

²⁶⁸ Curtius, T. J. *Prakt. Chemie.* **1881**, 24, 239.

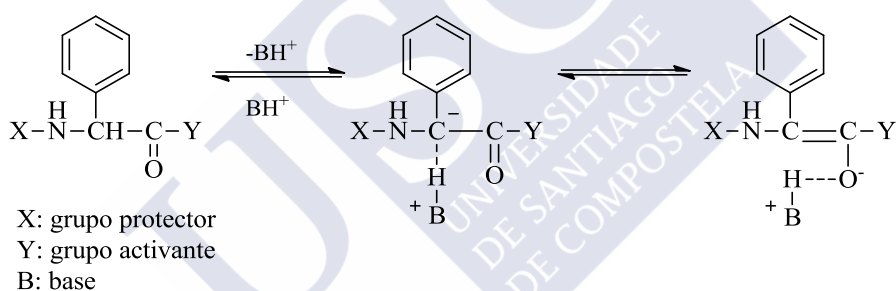
²⁶⁹ Fisher, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, 40, 1754.

²⁷⁰ Tsuda, Y.; Okada, Y. *Solution-Phase Peptide Synthesis*. En *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*, Hughes, A. B. Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, vol. 3, p. 203.

Uno de los objetivos de la síntesis de péptidos es la preparación de compuestos ópticamente puros, pero durante este proceso puede ocurrir una racemización. Esto ha sido intensamente estudiado, dado que 19 de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas son compuestos ópticamente activos y por tanto susceptibles de sufrir racemización. Siendo de gran importancia en la preparación de péptidos y proteínas la conservación de la configuración L de los aminoácidos naturales, para que estos conserven sus propiedades biológicas.

La racemización puede ocurrir tanto durante la protección y desprotección de los grupos funcionales de los aminoácidos, como en las etapas de activación de los mismos. Este proceso puede darse a través de dos posibles mecanismos:

Abstracción directa de un protón.²⁷¹ Ocurre en casos muy especiales, como por ejemplo la rápida racemización de derivados de la fenilglicina (Esquema 26) y transcurre por la abstracción directa del protón- α por bases fuertes. Esto puede evitarse mediante la aplicación de condiciones de reacción adecuadas y especialmente con el uso de aminas terciarias.²⁷²



Esquema 26

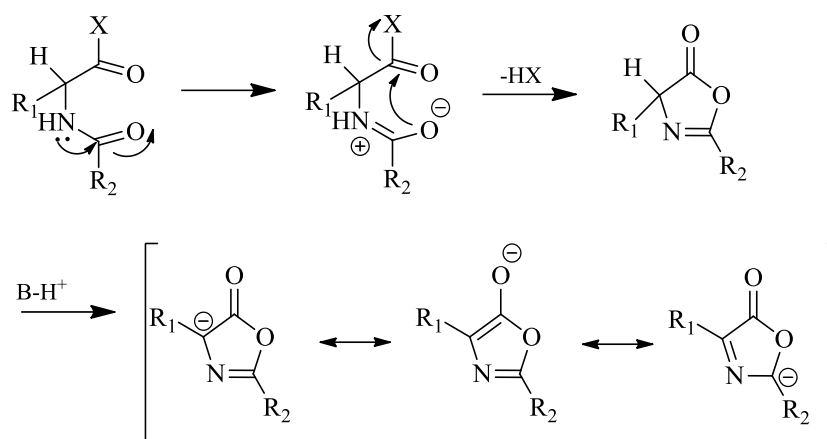
Mecanismo de formación de oxazol-5(4H)-onas.²⁷³ Con excepción de la prolina, los acil aminoácidos activados y los péptidos acilados pueden generar un compuesto heterocíclico bajo la influencia de una base (Esquema 27). Las oxazol-5(4H)-onas formadas conducen a intermediarios inestables vía tautomería, siendo la velocidad de racemización mayor que la de formación del enlace peptídico.

El riesgo de que se forme oxazol-5(4H)-onas se reduce cuando el grupo amino del aminoácido está protegido por un derivado de uretano, como el benciloxycarbonilo (Z) o el *tert*-butiloxycarbonilo (Boc), y en el caso de que se formara, ésta sería más resistente a la racemización; de ahí que el uso de grupos protectores derivados de uretano sea muy popular en la síntesis de péptidos.

²⁷¹ Bodanszky, M.; Klausner, Y. S.; Ondetti, M. A. *Peptide Synthesis* John Wiley & Sons, Ltd, New York, **1976**.

²⁷² (a) Kemp, D. S.; Wang, S. W.; Busby, G.; Hugel, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 1043. (b) Bodanzky, M.; Bodanszky, A.; Casaretto, M.; Zahn, H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, 26, 550.

²⁷³ Goodman, M.; Levine, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2918.



Esquema 27

2.2.2. Grupos Protectores

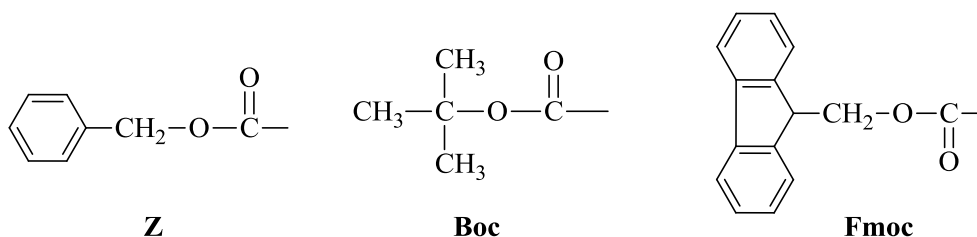
Los compuestos de partida para la síntesis de péptidos son los aminoácidos protegidos. Entre las características esenciales o deseables para un buen grupo protector, quizás la más importante sea que su eliminación pueda realizarse de manera rápida, por un mecanismo que no conduzca a la formación de productos secundarios y que tanto en el proceso de preparación del derivado protegido del aminoácido como en la eliminación del grupo protector, se preserve la integridad de la quiralidad del residuo.

Los grupos carboxílicos se protegen como ésteres, los grupos hidroxilo y tioles como éteres y los grupos amino como uretanos.

2.2.2.1. Protección del grupo amino

El método más empleado para la protección del grupo amino de los α -amino ácidos en síntesis de péptidos consiste en la formación de carbamatos, debido fundamentalmente a su alto grado de estabilidad óptica, es decir, dificultan la racemización de los centros quirales adyacentes a dichos grupos protectores. Los carbamatos se suelen preparar por reacción de la amina con el correspondiente anhídrido de ácido.

Entre los grupos protectores del grupo amino más utilizados se encuentran, el benciloxycarbonilo (Z), *tert*-butoxicarbonilo (Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc).

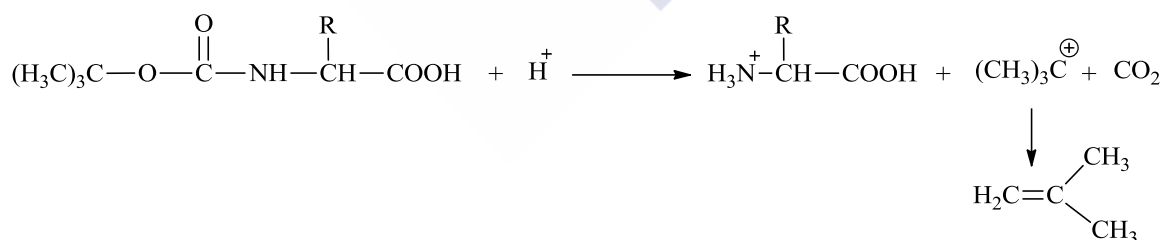


El **grupo Z**, introducido por Bergman y Zervas,²⁷⁴ puede ser eliminado fácilmente, siendo los métodos más empleados la hidrogenólisis catalítica a temperatura ambiente y a presión atmosférica,²⁷⁴ y la acidólisis HBr .²⁷⁵ Otros métodos alternativos emplean sodio en amoníaco líquido o HF líquido.

Diversas sustituciones sobre el grupo bencilo de Z han dado lugar a otros muchos grupos protectores, que se diferencian en su estabilidad y labilidad frente a diferentes condiciones químicas y su empleo puede resultar más o menos conveniente según los casos.

El **grupo Boc**, introducido por McKay y Albertson,^{276,277} es estable a la hidrogenación catalítica, por lo que en la síntesis peptídica puede utilizarse un grupo protector Z como temporal y un Boc como permanente o viceversa.

La manera más habitual de desproteger un Boc aminoácido consiste en el tratamiento con una disolución de TFA ²⁷⁸ a temperatura ambiente durante 30–60 min (Esquema 28) o HCl (cerca de 10 equiv.) en ácido acético, AcOEt o dioxano, consiguiéndose la eliminación del grupo Boc en menos de 30 min,^{276,279} condiciones en las que el grupo Z es prácticamente inerte.



Esquema 28

Los aminoácidos protegidos con el **grupo Fmoc** se obtienen a partir de su cloruro de acilo, esta reacción va acompañada de la formación de pequeñas cantidades de dipéptidos-Fmoc, por ello para evitar estas reacciones secundarias se ha recurrido al empleo de otros derivados de Fmoc, como:

²⁷⁴ Bergmann, M.; Zervas, L. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1932**, 65, 1192.

²⁷⁵ Ben-Ishai, D.; Berger, A. *J. Org. Chem.* **1952**, 17, 1564.

²⁷⁶ McKay, F. C.; Albertson, N. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4686.

²⁷⁷ (a) Tarbell, D. S.; Yamamoto, Y.; Pope, B. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1972**, 69, 730. (b) Moroder, L.; Hallett, A.; Wuensh, E.; Keller, O.; Wersin, G. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1976**, 357, 1651.

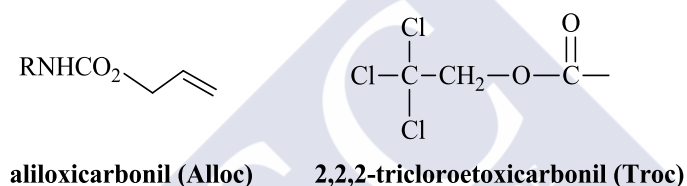
²⁷⁸ Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 98.

²⁷⁹ Klee, W.; Breener, M. *Helv. Chim. Acta* **1950**, 44, 2151.

Fmoc-OSu.²⁸⁰ Este grupo es muy estable en presencia de agentes ácidos, pero puede eliminarse fácilmente en ciertas condiciones básicas, generalmente se utiliza piperidina en DMF a temperatura ambiente,²⁸¹ procedimiento que no afecta a la mayoría de los otros grupos protectores, incluidos los grupos Z y Boc.

Entre otros grupos protectores de interés se encuentra el **aliloxicarbonilo (Alloc)**,²⁸² que puede ser eliminado fácilmente mediante una reacción de transferencia del resto alilo catalizada por paladio, que reacciona con diferentes especies nucleófilas bajo condiciones neutras.

El **grupo 2,2,2-tricloroetoxicarbonil (Troc)** representa otra alternativa de interés, es estable tanto en medio ácido como básico y se puede eliminar bajo condiciones suaves empleando zinc en polvo en ácido acético.²⁸³



También se pueden emplear otros grupos protectores que no son derivados de los uretanos, como el trifenilmetilo (Tri) y el 2-nitrofenilsulfonilo (Nps), grupos que también impiden la racemización y por ello son aplicados en ciertas estrategias de síntesis de péptidos.

El **grupo Tri** puede ser introducido en aminoácidos mediante reacción de clorotrifetilmetano con ésteres de aminoácidos en presencia de piridina, seguido de saponificación del grupo éster.²⁸⁴ El impedimento estérico que provoca puede dificultar la formación del enlace peptídico, sin embargo ha sido utilizado con buenos resultados en síntesis de péptidos.²⁸⁵

El **grupo Nps** es quizás uno de los grupos no-uretanos más empleado en síntesis de péptidos complejas.²⁸⁶ Los Nps-aminoácidos se obtienen por reacción de los aminoácidos con cloruro de 2-nitrofenilsulfonilo (NpsCl) en condiciones básicas. La forma de eliminación más sencilla de este

²⁸⁰ Kortenaar, T.; Van Dijk, P. B. W. Peeters, B. G.; Raaben, J. M.; Adams, P. J. H. M., Tesser, G. I. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, 27, 398.

²⁸¹ Carpino, L. A. *Acc. Chem. Res.* **1987**, 20, 401.

²⁸² Kunz, H.; Unverzagt, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, 23, 436.

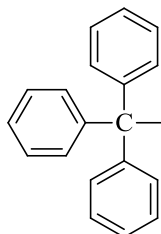
²⁸³ (a) Windholz, T. B.; Johnston, D. B. R. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 2555. (b) Lapatsanis, L.; Milias, G.; Froussios, K.; Kolovos, M. *Synthesis* **1983**, 8, 671.

²⁸⁴ (a) Helferich, B.; Moog, L.; Junger, A. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1925**, 58, 872. (b) Zervas, L.; Theodoropoulos, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1359. (c) Barlos, K.; Papaioannou, D.; Patrianakou, S.; Tseggenidis, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 11, 1950.

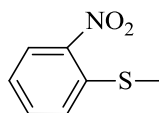
²⁸⁵ Sieber, P.; Kamber, B.; Hartmann, A.; Jöhl, A.; Riniker, B.; Rittel, W. *Helv. Chim. Acta* **1974**, 57, 2617.

²⁸⁶ (a) Wünsch, E.; Spangenberg, R. *Chem. Ber.* **1972**, 105, 740. (b) Zervas, L.; Borovas, D.; Gazis, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3660.

grupo consiste en el tratamiento con dos equivalentes de cloruro de hidrógeno anhidro, aunque a veces no pueden evitarse reacciones secundarias indeseadas, sobre todo en presencia de triptófano.



trifenilmetilo (Tri)



O-nitrofenilsulfonilo (Nps)

2.2.2.2. Protección del grupo carboxilo

La protección del grupo carboxilo no es tan necesaria como la del grupo amino al tener menor carácter nucleofílico, no obstante es conveniente protegerlo, sobre todo para aumentar la solubilidad del péptido formado en disolventes orgánicos y en los casos en que ese grupo no va a intervenir en la formación del enlace peptídico. El método más común para proteger los grupos α -carboxilos es la esterificación. La liberación del aminoácido de este grupo protector se realiza de manera similar a la indicada para los derivados del uretano, después de todo, estos son ésteres de un tipo especial.

Los primeros grupos utilizados para enmascarar el grupo carboxilo en α de los aminoácidos son el metoxilo (-OMe) y el etoxilo (-OEt). Los correspondientes ésteres pueden prepararse por reacción directa del aminoácido con un alcohol o empleando un halogenuro de alquilo. Estos ésteres no se ven afectados a temperatura ambiente por HBr/AcOH, TFA, condiciones de hidrogenación catalítica y tioles o aminas en solventes orgánicos, por lo tanto pueden combinarse con cualquier grupo protector de aminas.

La desprotección de los ésteres de metilo y etilo se consigue por saponificación, pudiendo ser también convertidos en las correspondientes amidas por tratamiento con amoníaco²⁸⁷ y en las hidrazidas por hidrazinolisis.²⁸⁸

El **éster bencilico** como grupo protector (-OBn) se popularizó por presentar menos problemas para la desprotección que los ésteres metílico o etílico, aunque al igual que estos últimos tiende a formar dicetopiperazinas. Se puede eliminar por saponificación, pero también con HBr/AcOH e

²⁸⁷ Bodanszky, M.; du Vigneaud, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5688.

²⁸⁸ Fujii, N.; Shimokura, M.; Nomizu, M.; Yajima, H.; Shono, F.; Tsuda, M.; Yoshitake, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 520.

hidrogenación catalítica,²⁸⁹ pero no por la acción del TFA. El éster bencílico puede igualmente ser convertido en la correspondiente amida por tratamiento con amoníaco²⁹⁰ y en la hidrazida con hidrato de hidrazina.²⁹¹

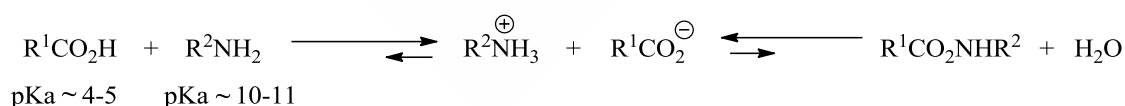
Los **ésteres *terc*-butílicos** (-*Ot*Bu) se pueden preparar por reacción de los aminoácidos con isobutileno empleando como catalizador ácido sulfúrico,²⁹² o por transesterificación a partir del aminoácido y acetato de *terc*-butilo en presencia de ácido perclórico.²⁹³

2.2.3. Formación del enlace peptídico

2.2.3.1. Generalidades

La aparentemente sencilla formación de un enlace peptídico, puede en principio realizarse empleando los procesos habituales para la formación de amidas. Sin embargo y a causa de la presencia de diferentes grupos funcionales en los aminoácidos (naturales y no naturales) y, especialmente, a los requerimientos necesarios para el mantenimiento de la quiralidad, el acoplamiento entre aminoácidos y péptidos bajo condiciones suaves puede constituir un importante reto.

La reacción entre un ácido carboxílico y una amina conduce en primer lugar a la formación de una sal estable, lo que significa que en estas condiciones la formación del enlace amida tiene que competir frente a unas condiciones termodinámicas adversas, como el equilibrio (Esquema 29) desplazado prioritariamente hacia la hidrólisis y no a la síntesis de la amida.²⁹⁴



Esquema 29

La condensación directa de la sal puede realizarse a altas temperaturas (160-180 °C),²⁹⁵ lo que generalmente es incompatible con la presencia de otras funciones en la molécula, aparte que para que tenga lugar el ataque del grupo amino, se necesita la previa activación del grupo carboxílico (Esquema 30).

²⁸⁹ Okada, Y.; Shintomi, N.; Kondo, Y.; Yokoi, T.; Joshi, S.; Li, W. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 45, 1860.

²⁹⁰ du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G.; Gordon, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 4879.

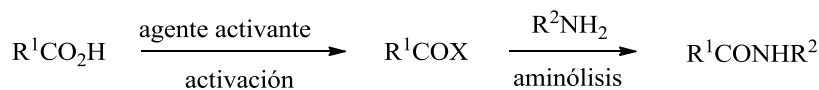
²⁹¹ Strachan, R. G.; Paleveda, W. J.; Nutt, R. F.; Vitali, R. A.; Veber, D. F.; Dickinson, M. J.; Garsky, V.; Walton, E.; Jenkins, S. R.; Holly, F. W.; Hirschmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 503.

²⁹² Roeske, R. W. *Chem. and Ind.* **1969**, 1121.

²⁹³ Taschner, E.; Chimiak, A.; Bator, B.; Solowska, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1961**, 646, 134.

²⁹⁴ Ulijn, R. V.; Moore, B. D.; Janssen, A. E. M.; Halling, P. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, 1024.

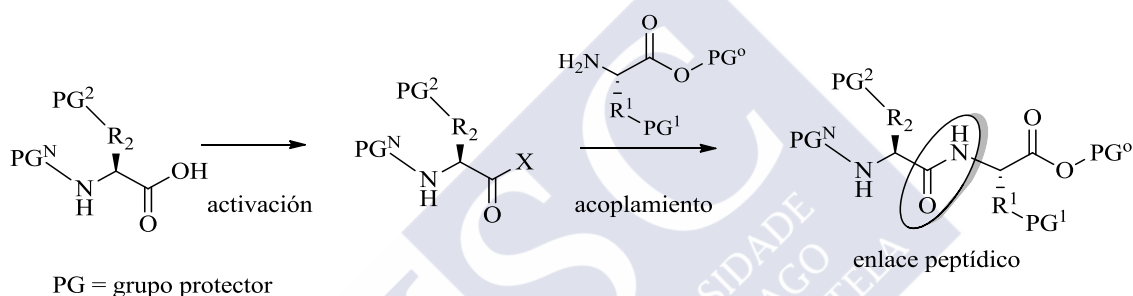
²⁹⁵ Jursic, B. S.; Zdravkovski, Z. *Synth. Commun.* **1993**, 23, 2761.



Esquema 30

Para solventar estos problemas inherentes a la formación de las amidas, se han desarrollado diversos métodos y estrategias. Con frecuencia es preciso ensayar diferentes condiciones para encontrar el método más adecuado para cada caso concreto.

Todos los métodos de acoplamiento implican en primer lugar la activación del grupo carboxílico del primer aminoácido, para que el segundo aminoácido pueda establecer el enlace peptídico mediante el ataque nucleófilo de su grupo amino.



Esquema 31

Los ácidos carboxílicos pueden ser activados como haluros de acilo, acilazidas, acilimidazoles, anhídridos, ésteres etc.²⁹⁶ Para acoplar grupos carboxílicos activados con aminas se pueden seguir diferentes alternativas:

- el agente acilante intermediario se prepara y aísla, para posteriormente someterlo al proceso de aminólisis,
- el agente acilante se prepara en una etapa independiente y a continuación se trata con la amina,
- el agente acilante se genera *in situ*, a partir del ácido carboxílico en presencia de la amina por adición al medio de reacción de un activante o agente de acoplamiento.

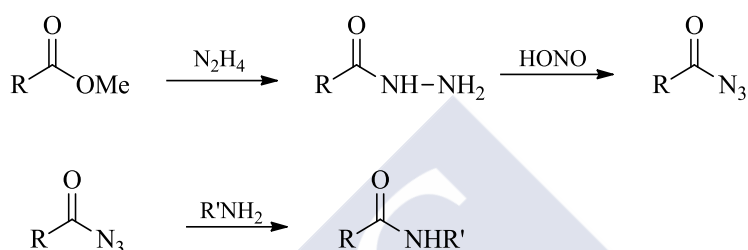
2.2.3.2. Principales agentes acilantes y reactivos de acoplamiento empleados en síntesis de péptidos

- **Cloruros de acilo:** reaccionan con aminas para generar amidas con el concurso de una base adicional (Et₃N, DIEA, *N*-metilmorfolina) para atrapar el HCl liberado y evitar la formación del clorhidrato de la amina, no reactivo. Presentan poca utilidad en el acoplamiento de péptidos debido al

²⁹⁶ Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827.

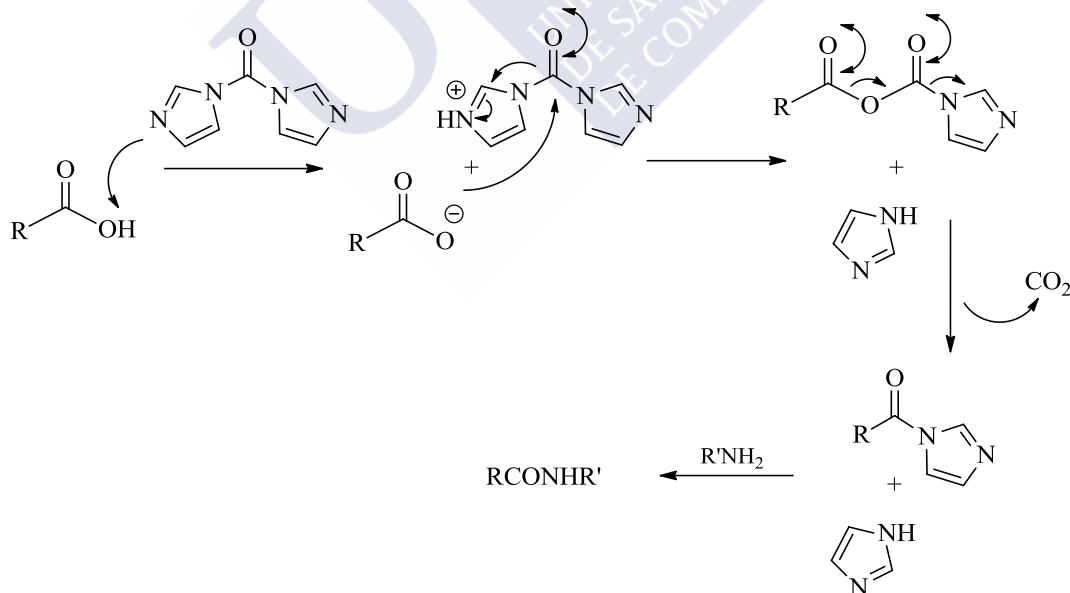
riesgo de hidrólisis, racemización, ruptura de grupos protectores y otras reacciones colaterales. Los **fluoruros de acilo** son menos sensibles que los cloruros y más reactivos frente a las aminas, además son compatibles con *N*-protecciones con Fmoc o Z.

- **Acilazidas:** fueron unos de los primeros derivados de ácido utilizados en síntesis de péptidos²⁹⁷ aplicando el método de Curtius²⁹⁸ (Esquema 32); presentan el problema de que con frecuencia como reacción secundaria tiene lugar una transposición de Curtius que conduce a un isocianato indeseado.



Esquema 32

- **Carbonildiimidazol (CDI):**²⁹⁹ muy utilizado en síntesis de péptidos. Agente de acoplamiento que forma con el ácido carboxílico el **acilimidazol activado** en un tiempo relativamente corto ($\sim 1h$).



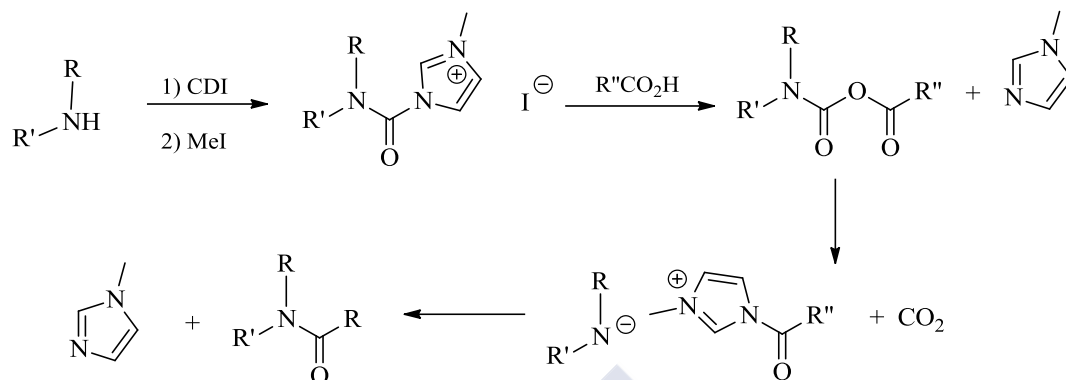
Esquema 33

²⁹⁷ Klausner, Y.; Bodansky, M. *Synthesis* **1974**, 549–559

²⁹⁸ Curtius, Th. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, 35, 3226–3228.

²⁹⁹ Paul, R.; Anderson, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4596.

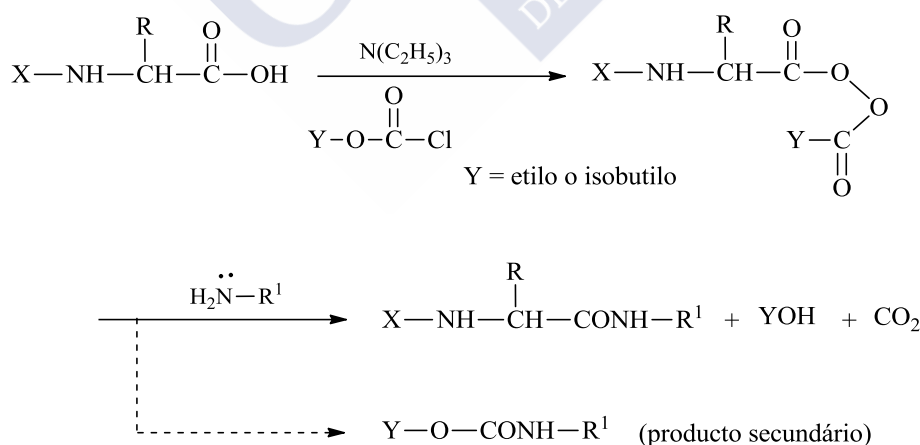
Las **sales de carbonilimidazolio** obtenidas por reacción del CDI con aminas secundarias y yoduro de metilo, resultan eficaces para la formación de amidas terciarias.³⁰⁰



Esquema 34

- **Anhídridos:** reaccionan con las aminas para generar amidas. La mayor eficacia se consigue con el empleo de anhídridos mixtos del ácido carbónico, debido a que el centro electrófilo del carbonato es más reactivo que el del carboxilato, por la menor estabilización por resonancia de su carbono carbonílico.

Entre los más utilizados se encuentran los preparados a partir del cloroformiato de etilo³⁰¹ y el cloroformiato de isobutilo.³⁰² El mecanismo de formación del enlace amida se muestra a continuación (Esquema 35).



Esquema 35

- **Carbodiimidas:** como la dicitlohexilcarbodiimida (DCC),³⁰³ diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC o WSC)³⁰⁴ o su clorhidrato (EDAC) (Figura

³⁰⁰ Grzyb, J. A.; Batey, R. A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7485.

³⁰¹ Boissonas, R. A. *Helv. Chim. Acta*, **1951**, 34, 874.

³⁰² (a) Vaughan, J. R.; Osato, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 676. (b) Chaudhary, A.; Girgis, M.; Prashad, M.; Hu, B.; Har, D.; Repic, O.; Blacklock, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 5543.

25). Se usan con frecuencia para la formación del enlace amida en un proceso en *tándem* (Esquema 36); la carbodiimida reacciona con el ácido carboxílico formando el anhídrido mixto de la *O*-acilisourea, que a su vez reacciona directamente con la amina para dar la amida y la correspondiente urea como producto secundario. El que las ureas formadas a partir de la DCC y de la DIC presenten una solubilidad similar al péptido buscado dificulta su aislamiento, por lo que se han desarrollado otras carbodiimidas cuyas ureas puedan ser separadas mediante extracción con agua, como la EDC.

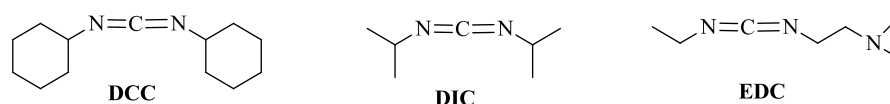
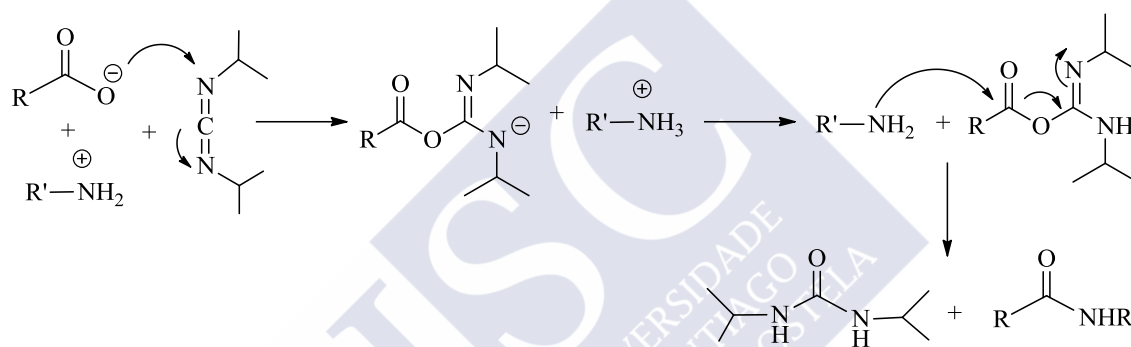


Figura 25. Estructuras de las carbodiimidas más comunes.



- **Ésteres activados:** del tipo de ésteres aromáticos, que generalmente son más fácilmente hidrolizables que los ésteres alquílicos y más propensos a reaccionar con un amplio rango de nucleófilos; además y más importante, si cabe, es que reaccionan limpiamente con aminas bajo condiciones suaves y provocan escasa racemización. El aumento de la electrofilia del centro carbonílico en este tipo de ésteres comparado con el de los ésteres alquílicos, se debe al carácter electrodonador de los alcoholes seleccionados, que se elegirán en base al tipo de aplicación para la que se requiera.

Entre los agentes de acoplamiento más empleados con esta finalidad se encuentran el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), que con frecuencia se emplea combinado con DCC,^{303,306} el *p*-nitrofenol (PNP)³⁰⁷ y el pentafluorofenol;³⁰⁸ presentan la ventaja de su fácil utilización ya que conducen *in situ* a la formación de los ésteres activados. En los últimos años otros derivados del benzotriazol como el 6-

³⁰³ Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067.

³⁰⁴ Sheehan, J. C.; Cruickshank, P. A. Boshart, G. L. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525.

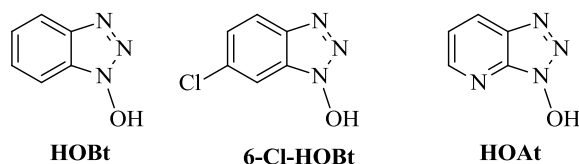
³⁰⁵ Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillesen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927.

³⁰⁶ König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, 103, 2034.

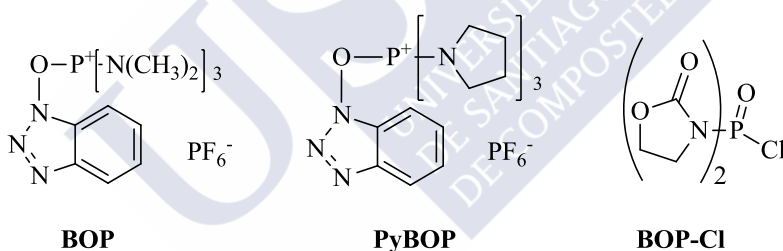
³⁰⁷ Gangwar, G. M.; Pauletti, T.; Siahaan, J.; Stella, V. J.; Borchardt, R. T. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1356.

³⁰⁸ Kisfaludy, L.; Schon, I.; Szirtes, T.; Nyeki, O.; Low, M. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 1785.

cloro-1-hidroxibenzotriazol (6-Cl-HOBt) y el 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) han mostrado mayor eficacia que el HOBt.^{309,310}



- **Sales de fosfonio y amidinio/uronio:** el primer ejemplo de este grupo de agentes de acoplamiento desarrollado por Castro y col.³¹¹ fue el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP). Es un reactivo fácil de manipular que promueve un rápido acoplamiento, pero presenta como inconveniente la formación de un compuesto secundario muy toxico, la hexametilfosfortriamida (HMPA).³¹² Sobre la base de la estructura del BOP, Castro y col. desarrollaron el hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyBOP), que al llevar pirrolidina en lugar de dimetilamina evita la formación de HMPA.³¹³ Con posterioridad se han desarrollado otros reactivos de acoplamiento derivados de sales de fosfonio como el cloruro de ácido bis(2-oxo-3-oxazolidino)fosfínico BOP-Cl.³¹⁴



También diferentes sales de uronio han sido desarrolladas como agentes de acoplamiento para la síntesis de péptidos. Entre ellas se incluyen hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU),³¹⁵ y su correspondiente tetrafluoroborato (TBTU),³⁰⁵ y más recientemente su azaanálogo, el hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU).³⁰⁹

³⁰⁹ Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.

³¹⁰ Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Gge, C. M.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441.

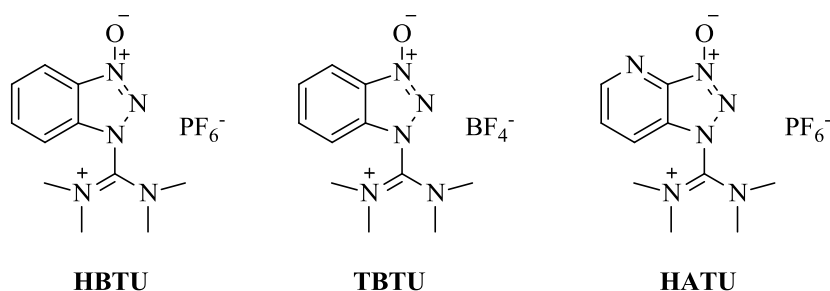
³¹¹ Castro, B.; Dormay, J. R.; Evin, G.; Selve, C., *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219.

³¹² Le-Nguyen, D.; Heitz, A.; Castro, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1987**, 1915.

³¹³ Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.

³¹⁴ Diago-Meseguer, J.; Palomo-Coll, A. L.; Fernández-Lizarde, J. R.; Zugaza-Bilbao, A. *Synthesis* **1980**, 547.

³¹⁵ Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1269.



El HBTU y el TBTU se diferencian solamente en sus contraiones, y estudios comparativos han mostrado que los aniones no ejercen una influencia significativa sobre la velocidad del acoplamiento o la racemización.

Durante bastante tiempo se creyó que el HBTU y sus congéneres poseían estructura de sales de uronio, pero estudios estructurales más profundos mostraron que existen en forma de guanidinio-*N*-óxidos,³¹⁰ aunque por costumbre todavía se les denomina como reactivos de tipo uronio.

A diferencia de las carbodiimidas o los reactivos de fosfonio, las sales de uronio pueden formar derivados de tetrametilguanidinio con las aminas libres, lo que constituye una reacción secundaria. Para evitarlo no se debe emplear demasiado exceso del reactivo y el ácido carboxílico deberá activarse antes de ponerlo en contacto con los demás reactivos.

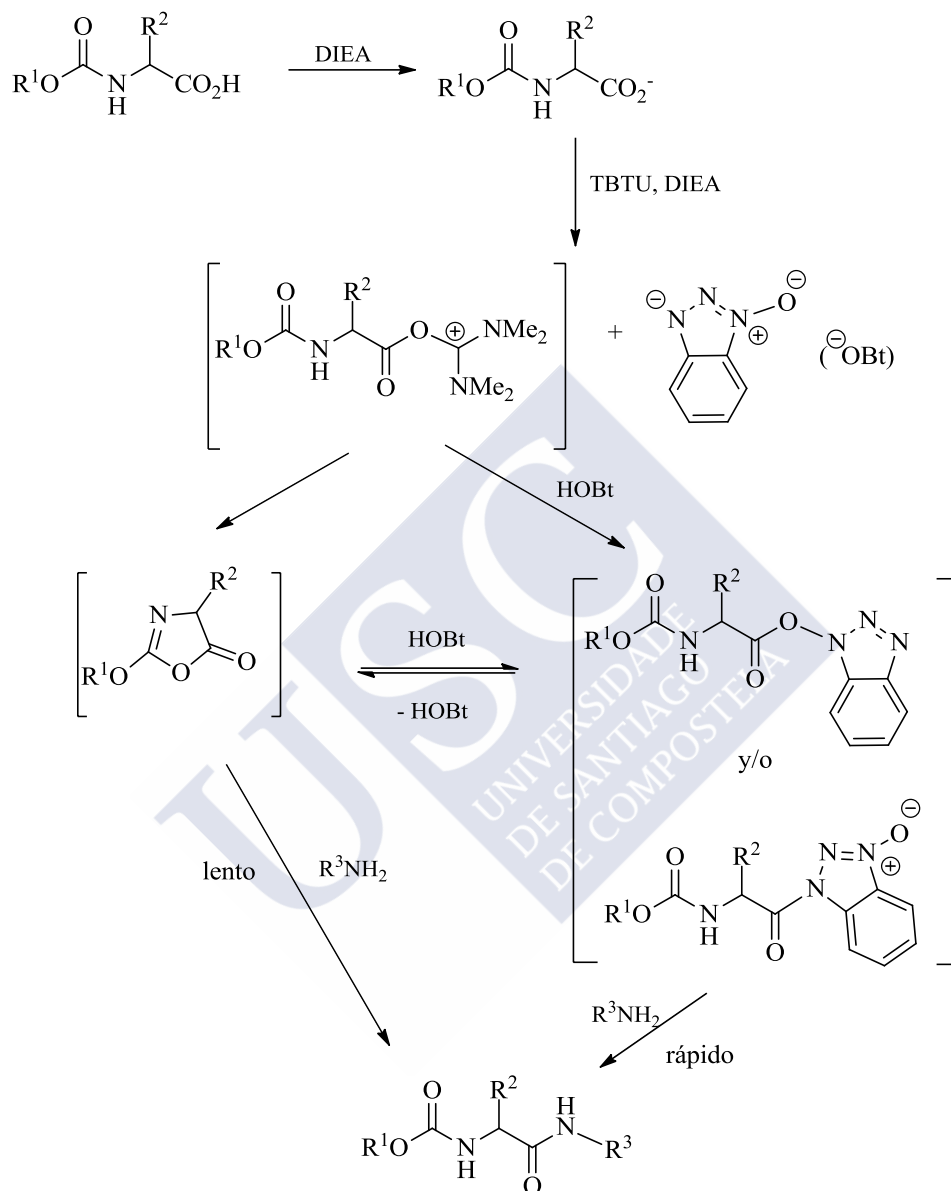
Actualmente el HATU puede ser considerado como el reactivo de mayor utilidad para el acoplamiento de péptidos, empleándose para la formación de grupos amida difíciles, tanto en fase sólida como en disolución, siendo especialmente eficaz para la macrociclación, condensación de fragmentos y acoplamiento de aminoácidos *N*-sustituídos.³¹⁶

Mecanicamente, las sales de fosfonio y uronio funcionan de igual manera, el ion carboxilato formado a partir del componente portador del grupo ácido carboxílico por reacción con la amina terciaria, ataca a la especie de uronio/guanidina formando el intermediario de aciluronio, altamente reactivo, que se transforma en el éster activo, especie predominante en el medio de reacción y que sufre la aminólisis.³¹⁷ No está rotundamente admitido si el propio aciluronio inicialmente formado interviene directamente en la aminólisis, pero si hay constancia de la existencia de una vía alternativa que transcurre a través de la estabilización del catión aciluronio, que conduce a la

³¹⁶ Kamencka, T. M.; Danishefsky, S. J. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 41.

³¹⁷ Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C. *Synthesis* **1984**, 572.

formación de una oxazol-5(4H)-ona,³¹⁸ que puede estar en equilibrio con el correspondiente éster activo.³¹⁹



Esquema 37. Formación del enlace peptídico mediado por TBTU.

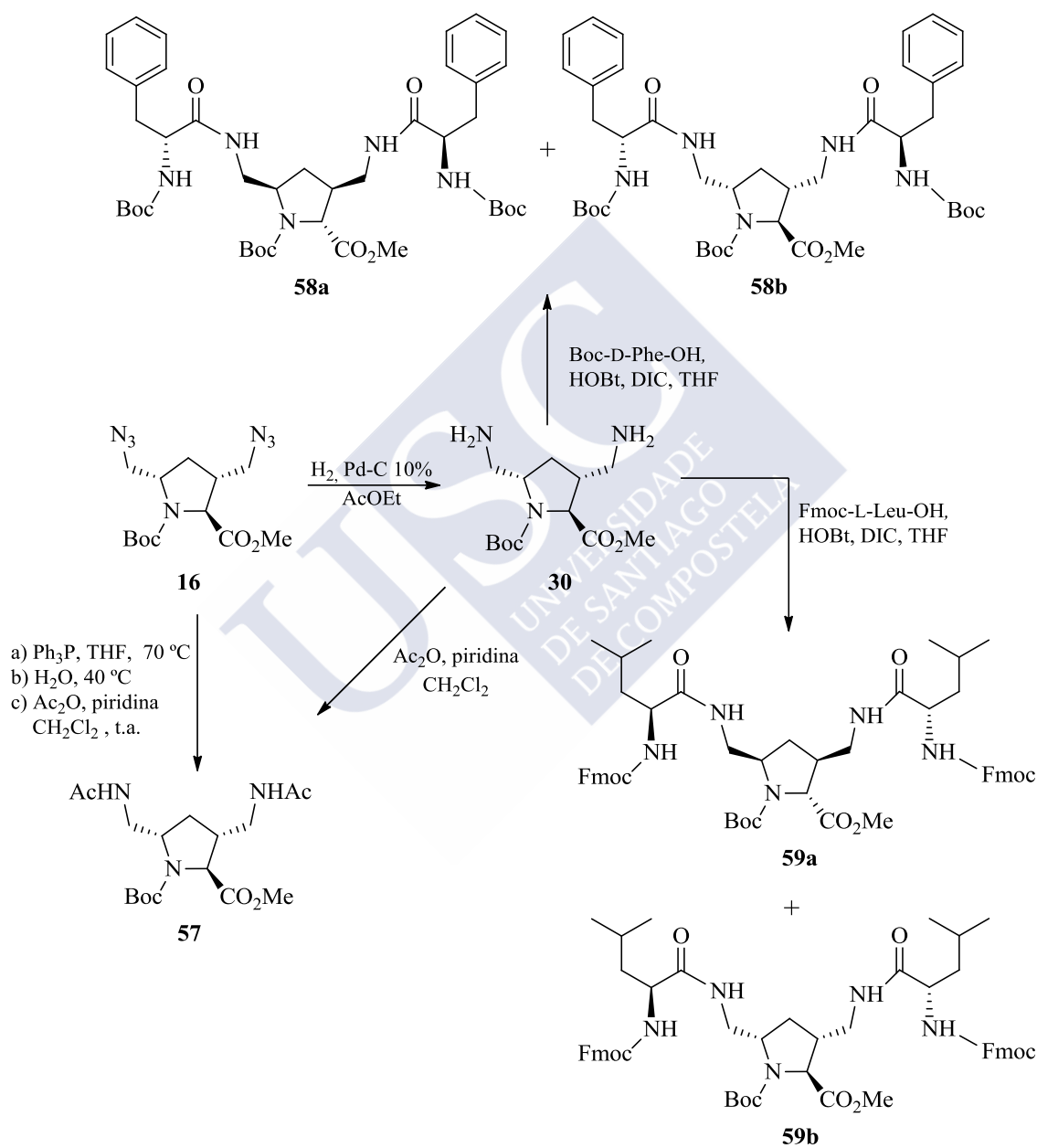
³¹⁸ Benoiton, N. L.; Lee, Y. C.; Steinaur, R.; Chen, F. M. F. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, 40, 559.

³¹⁹ (a) Hanay, C.; Beyermann, M.; Henklein, P. *Peptides*, Ramage, R.; Epton, R. Eds., Mayflower, Birmingham, UK, **1998**. (b) Hanay, C.; Beyermann, M.; Henklein, P. *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*, Epton, R. Ed., Mayflower, Birmingham, UK, **1996**. (c) Chen, F. M.; Benoiton, N. L. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 36, 476.

2.2.4. Resultados propios

2.2.4.1. Preparación de diamidas derivadas de 3,5-bis(aminometil)prolinas

Continuando con nuestros esfuerzos en la búsqueda de nuevos aminoácidos cíclicos,³²⁰ se prepararon a partir de la diaminometilprolina **30**, las diamidas **57–59**, (Esquema 38).



Esquema 38

³²⁰ (a) Hruby, V. J.; Li, G.; Haskell-Luevano, C.; Shenderovich, M. *Biopolymers* **1997**, 43, 219; (b) Gante, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1994**, 33, 1699; (c) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1993**, 32, 1244.

La acetilación de **30** se llevó a cabo empleando Ac₂O y piridina en CH₂Cl₂,³²¹ obteniéndose **57** con un 46% de rendimiento. Alternativamente se abordó la preparación de este derivado a partir del compuesto **16** empleando un proceso en *tándem* recogido en la reacción de Staudinger-Vilarrasa: calefacción a 70 °C con Ph₃P en THF durante 5,5 h, posterior adición de H₂O y agitación de la mezcla de reacción resultante a 40 °C durante 15 h. Tras la eliminación de los disolventes, al residuo se le añadió Ac₂O y piridina en CH₂Cl₂ y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, obteniéndose el derivado **57** mezclado con Ph₃PO (rendimiento ~ 45%, deducido del análisis del espectro ¹H RMN de dicha mezcla).

Con el objetivo de preparar otras diamidas en las que el resto de ácido carboxílico procediese de un α-aminoácido, y evitar además las dificultades derivadas de la formación del óxido de trifenilfosfina en las reacciones Staudinger-Vilarrasa, se ensayaron las reacciones de **30** con Boc-D-Phe-OH y Fmoc-L-Leu-OH. La elección de estos aminoácidos se realizó en base a su posible absorción a la luz ultravioleta, dadas las dificultades encontradas en ensayos previos, para seguir el progreso de este tipo de reacciones por cromatografía en capa fina. Los compuestos **58** y **59** se obtuvieron con un 21% y 7% de rendimiento respectivamente, tras separación mediante varias CC y CCF preparativas.

2.2.4.2. Preparación de dipéptidos

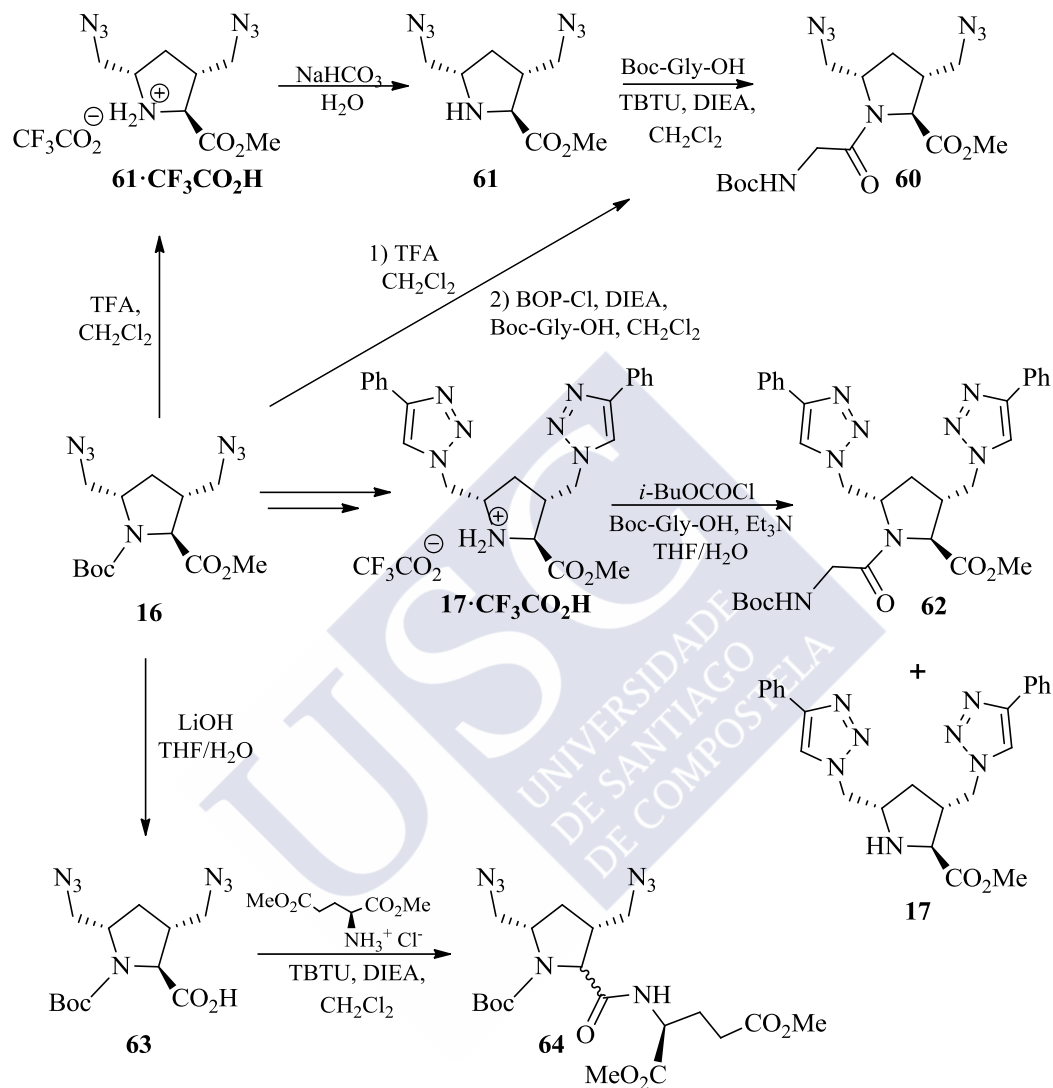
Para la síntesis de los tripéptidos análogos del GPE en los que la prolina es el resto aminoacídico situado en el centro del tripéptido, se intentó el acoplamiento del correspondiente compuesto prolina-mimético con *N*-Boc-glicina y con el clorhidrato de L-glutamato de dimetilo. La comparación de los resultados obtenidos en la preparación de los dipéptidos, **60**, **62** y **64** (Esquema 39) permitió la selección del dipéptido intermedio y de la secuencia de realización de los procesos de acoplamiento para la síntesis de los tripéptidos.

Inicialmente para la preparación del dipéptido **60**, se trató el compuesto **16** con *N*-Boc-glicina en presencia de TFA, empleando como reactivo de acoplamiento BOP-Cl,³²² (Tabla 3, entrada 1). Dado el bajo rendimiento alcanzado, un segundo experimento se llevó a cabo sobre el bis(azidometil) éster **61**, obtenido en un 62% de rendimiento por desprotección del grupo amino del anillo de pirrolidina de **16** con exceso de TFA en CH₂Cl₂, y posterior tratamiento de la sal formada **61**·CF₃CO₂H, con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ a temperatura ambiente durante 2 h,

³²¹ Mita, T.; Fukuda, N.; Roca, F. X.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *Organic Lett.* **2007**, 9, 259.

³²² Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Muir, V. J.; Lai, M. Y. H.; Trotter, N. S.; Callis, D. J. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10018.

empleando el TBTU³²³ como agente de acoplamiento, siendo en este caso el rendimiento ligeramente superior (Tabla 3, entrada 2).



Esquema 39

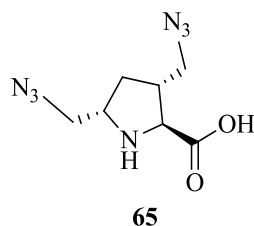
³²³ Fernández, F.; Pampím, B.; González, M. A.; Estévez, J. C.; Estévez, R. J. *Tetrahedron-Asymm.* **2010**, *21*, 2021.

Tabla 3. Síntesis de los dipéptidos **60**, **62** y **64**

Ensayo	Compuesto	Reactivos y disolventes	tiempo (h)	Resultados (%)
1	16	Boc-Gly-OH, TFA, BOP-Cl, DIEA, CH ₂ Cl ₂	17	60 (6,5)
2	61	Boc-Gly-OH, TBTU, DIEA, CH ₂ Cl ₂	52	60 (12) + 61 (48)
3	17 ·CF ₃ CO ₂ H	Boc-Gly-OH, BOP-Cl, DIEA, CH ₂ Cl ₂	17	17 (63)
4	17 ·CF ₃ CO ₂ H	Boc-Gly-OH, <i>i</i> -BuOCOC ₂ H ₅ , Et ₃ N, THF, H ₂ O	20	62 (13) + 17 (25)
5	17 ·CF ₃ CO ₂ H	Boc-Gly-OH, <i>i</i> -BuOCOC ₂ H ₅ , Et ₃ N, THF, H ₂ O	120	62 (12)
6	63	clorhidrato de L-glutamato de dimetilo, TBTU, DIEA, CH ₂ Cl ₂	48	64 (90)

Para la preparación del dipéptido portador de los anillos triazólicos **62**, se ensayó a partir de **17**·CF₃CO₂H, y BOP-Cl como agente acoplante, recuperándose gran parte del compuesto **17**, como único producto de reacción (Tabla 3, entrada 3). A la vista de estos resultados se cambió el agente acoplante por el cloroformiato de isobutilo (*i*-BuOCOC₂H₅), obteniéndose el dipéptido **62** aunque con bajo rendimiento (Tabla 3, entrada 4) y recuperándose parte del compuesto **17** inalterado. Un nuevo ensayo en similares condiciones en el que se aumentó de forma sustancial el tiempo de reacción, no solo no condujo a mejor rendimiento, sino que además llevó a la total pérdida del material de partida (Tabla 3, entrada 5).

Ante los pobres resultados obtenidos en la síntesis de los dipéptidos **60** y **62**, se procedió a preparar el dipéptido **64**. Como paso previo a la reacción de acoplamiento, se hidroliza el éster metílico **16** con LiOH en una mezcla a partes iguales de THF-H₂O a temperatura ambiente durante 48 h. La posterior adición de H₂SO₄ 1 M hasta pH 4-5, eliminación de los disolventes a vacío y extracción del residuo sólido resultante con Et₂O/EtOH, permite obtener, tras la eliminación a vacío de los disolventes del extracto obtenido, el ácido **63** con un rendimiento prácticamente cuantitativo. Para mantener este resultado es indispensable que el pH del medio no baje de 4 durante el proceso de acidificación, ya que esto puede provocar la pérdida del grupo Boc, además de la hidrólisis del éster buscada. En alguno de los ensayos realizados, debido a esta causa se formó una pequeña cantidad del aminoácido **65**, resultando su separación de **63** bastante engorrosa.



Para el acoplamiento de **63** con clorhidrato de L-glutamato de dimetilo se empleó el TBTU como acilante, rindiendo los dipéptidos **64** en un excelente rendimiento (Tabla 3, entrada 6).

Por reacción del ácido **63** con el clorhidrato del L-leucinato de metilo empleando TBTU y DIEA en CH₂Cl₂ (Esquema 40), se obtuvo la mezcla de los dipéptidos diastereoisómeros **66a** y **66b** con un magnifico rendimiento (96%) que fueron eficazmente separados por cromatografía en columna. La configuración absoluta del dipéptido **66a** se determinó de forma inequívoca mediante el análisis de rayos X de un monocristal (Figura 26)³²⁴, lo que confirma también la configuración absoluta del otro estereoisómero **66b** y consecuentemente de cada uno de los compuestos preparados a partir de ambos diastereoisómeros.

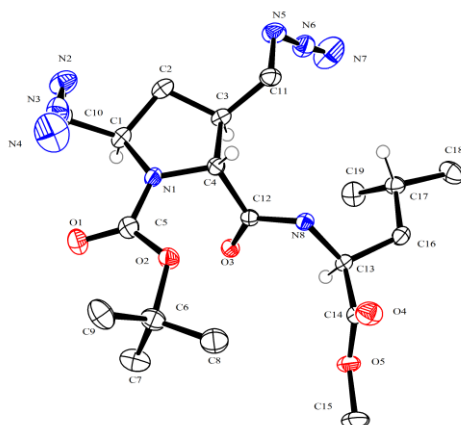
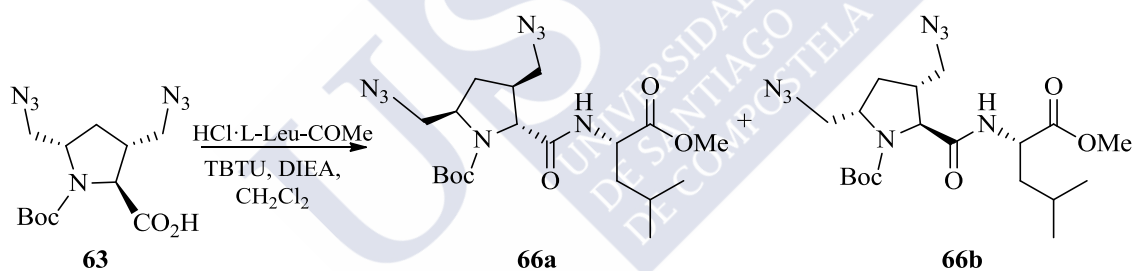


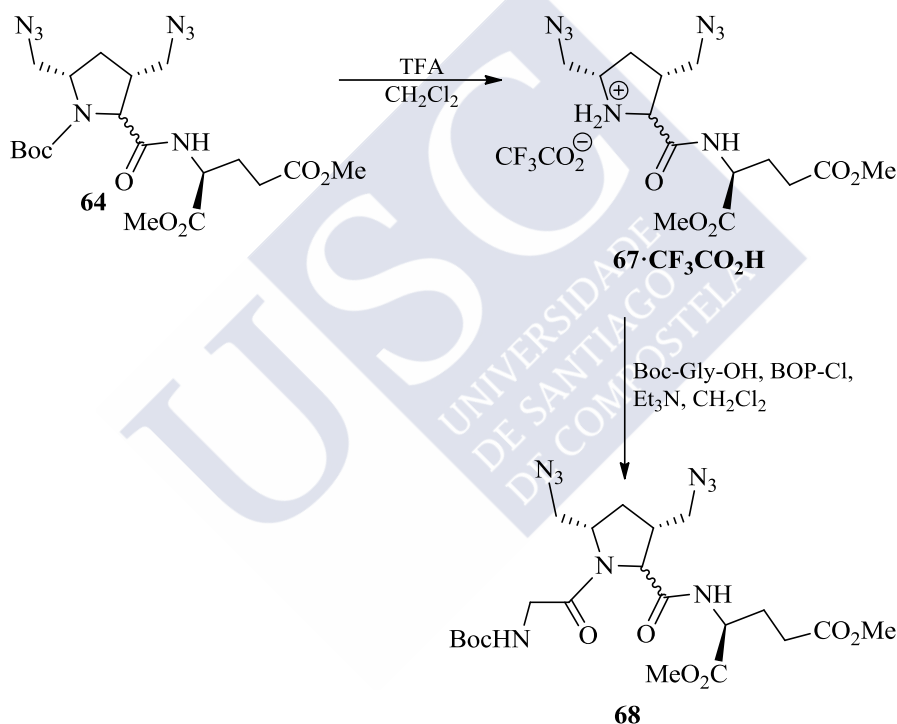
Figura 26. Diagrama ORTEP del compuesto **66a**.

³²⁴ Los datos cristalográficos del compuesto **66a** han sido depositados en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge como publicación privada CCDC 924409. Copias de estos datos pueden obtenerse libres de cargo en la aplicación del CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.

2.2.4.3. Preparación del tripéptido 68 análogo al GPE

Para la eliminación del grupo Boc del dipéptido **64** se utilizó TFA, formándose **67·CF₃CO₂H** con un 75% de rendimiento; su reacción con Boc-Gly-OH empleando TBTU como agente acoplante en las condiciones usadas en los casos anteriores no condujo al producto pretendido, recuperándose como único compuesto un 60% de **67·CF₃CO₂H**.

Aunque nuestra experiencia en la síntesis de dipéptidos no fue buena con el empleo del BOP-Cl, Brimble y col.³²² describen muy buenos resultados en la síntesis de análogos del GPE, por ello se recurrió a la aplicación de su metodología, obteniéndose la mezcla de diastereoisómeros **68** (37%), que resultó imposible de separar por cromatografía en columna (Esquema 41).



Esquema 41

En un intento de separar la mezcla de diastereoisómeros formada en la preparación del tripéptido tipo **68** y además evaluar la influencia del grupo protector del aminoácido en el rendimiento químico de la reacción, se ensayó el tratamiento de **67·CF₃CO₂H** con derivados de glicina portadores de otros grupos carbamato (Fmoc y Z) en las condiciones anteriormente empleadas. La reacción con Fmoc-Gly-OH dio lugar a una mezcla compleja de compuestos, de la cual no fue posible aislar por CC, ni detectar en ella con seguridad mediante espectros de RMN, la presencia del tripéptido deseado.

³²² Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Muir, V. J.; Lai, M. Y. H.; Trotter, N. S.; Callis, D. J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10018.

Sin embargo, del bruto de reacción de **67**·CF₃CO₂H con Z-Gly-OH, se separó por CCF una fracción enriquecida en la mezcla de los correspondientes tripéptidos diastereoisómeros (¹H RMN).

Por ello se realizaron dos nuevos ensayos de acoplamiento de **67**·CF₃CO₂H con Boc-Gly-OH empleando DCC, y Et₃N en CH₂Cl₂,¹²⁰ en un caso ó utilizando el método más clásico de formación de amidas en otro, véase exceso de DCC y HOBt,^{97b} que condujeron a la obtención de mezclas complejas de compuestos, de muy difícil de separación.

2.2.4.4. Preparación de los tripéptidos 73–75 y 81–83 análogos de PLG

Para la síntesis de los compuestos péptido-miméticos análogos de PLG, se realizó eficazmente la hidrólisis de los ésteres metílicos de los dipéptidos **66a** y **66b** por tratamiento de los mismos con LiOH en una mezcla de THF y H₂O a temperatura ambiente (Esquema 42), rindiendo los correspondiente ácidos carboxílicos **69a** (73%) y **69b** (90%).

El posterior acoplamiento de **69a** y **69b** con el clorhidrato del glicinato de metilo, TBTU y DIEA en CH₃CN, condujo a los correspondientes tripéptidos ésteres **70a** y **70b** con rendimientos del 82% y 86% respectivamente. El compuesto **70a** fue convertido en el ácido carboxílico **71a** por tratamiento con LiOH en THF/H₂O. Sin embargo, la hidrólisis del compuesto **70b** con LiOH puso de nuevo de manifiesto la gran labilidad del grupo Boc; así cuando en el proceso de acidificación con H₂SO₄ 1 M el pH alcanza un valor ligeramente inferior a 4, el grupo Boc es eliminado y tiene lugar simultáneamente la transesterificación del éster metílico, aislándose el éster etílico **70b'**.

La transformación de los ésteres **70a** y **70b** en las respectivas carboxamidas **72a** y **72b** se consiguió, con excelentes rendimientos, por tratamiento de los mismos con una disolución metanólica saturada de amoníaco.¹⁰²

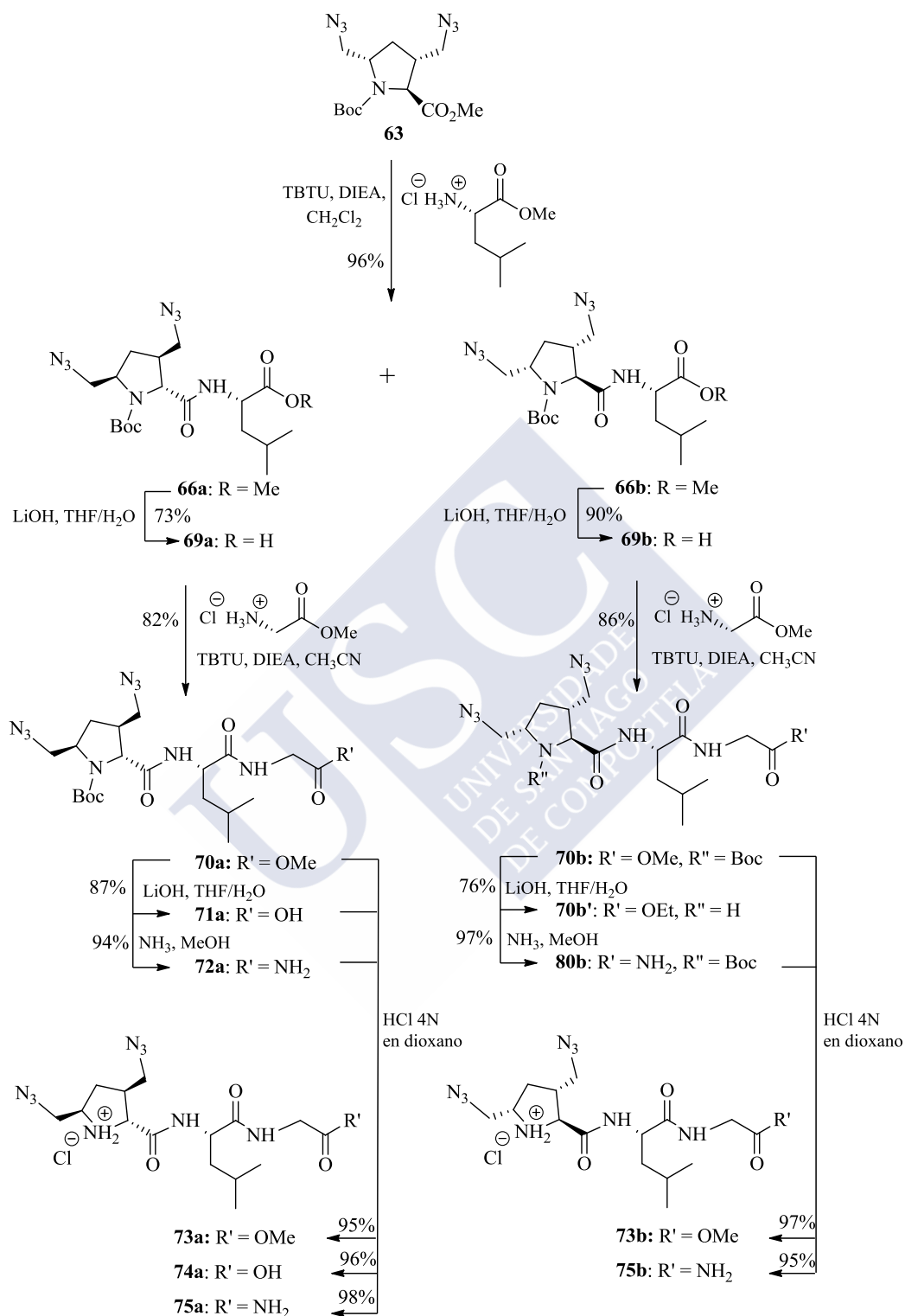
Finalmente la eliminación del grupo *tert*-butiloxicarbonilo de los tripéptidos **70–72** se llevó a cabo por tratamiento de los mismos con HCl 4N en dioxano a temperatura ambiente,³²⁵ para rendir los correspondientes clorhidratos análogos de PLG, **73–75**.

¹²⁰ Trotter, N. S.; Brimble, M. A.; Harris, P. W. R.; Callis, Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 501.

^{97b} Khalil, E. M.; Ojala, W. H.; Pradhan, A.; Nair, V. D.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 628.

¹⁰² Dolbeare, K.; Pontoriero, G. F.; Gupta, S. K.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 727.

³²⁵ Fisher, A.; Mann, A.; Verma, V.; Thomas, N.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 307.



Esquema 42

Una ruta sintética similar se realizó sustituyendo, en la formación del dipéptido, el clorhidrato del L-leucinato de metilo, por el de la L-valina, homólogo inferior de la L-leucina, con el objetivo de comparar las diferencias de reactividad química, así como la actividad biológica en series homólogas.

Para ello se aplicó la metodología anteriormente reseñada y los resultados fueron similares. De nuevo se consiguió con facilidad la separación mediante cromatografía en columna de los dipéptidos diastereoisómeros **76** (92%), así como también pudo determinarse de forma inequívoca la configuración absoluta del dipéptido **76a** mediante el análisis de rayos X de un monocristal (Figura 27)³²⁶; lo que de nuevo permitió confirmar la configuración absoluta del otro estereoisómero **76b**, y consecuentemente de cada uno de los compuestos preparados a partir de los respectivos diastereoisómeros (Esquema 43).

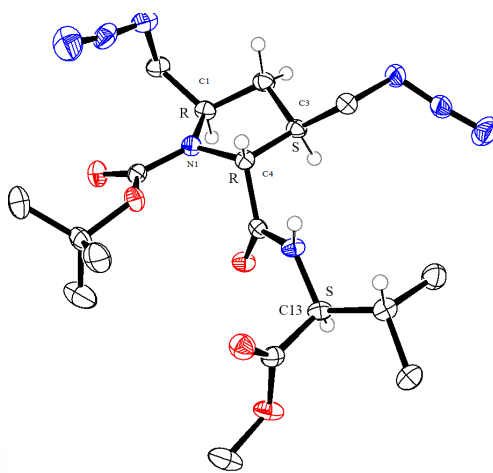
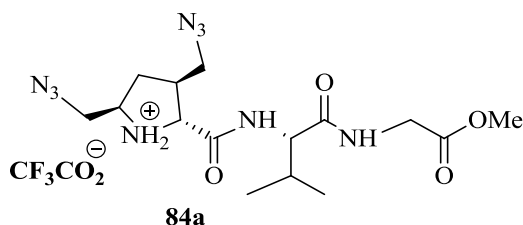


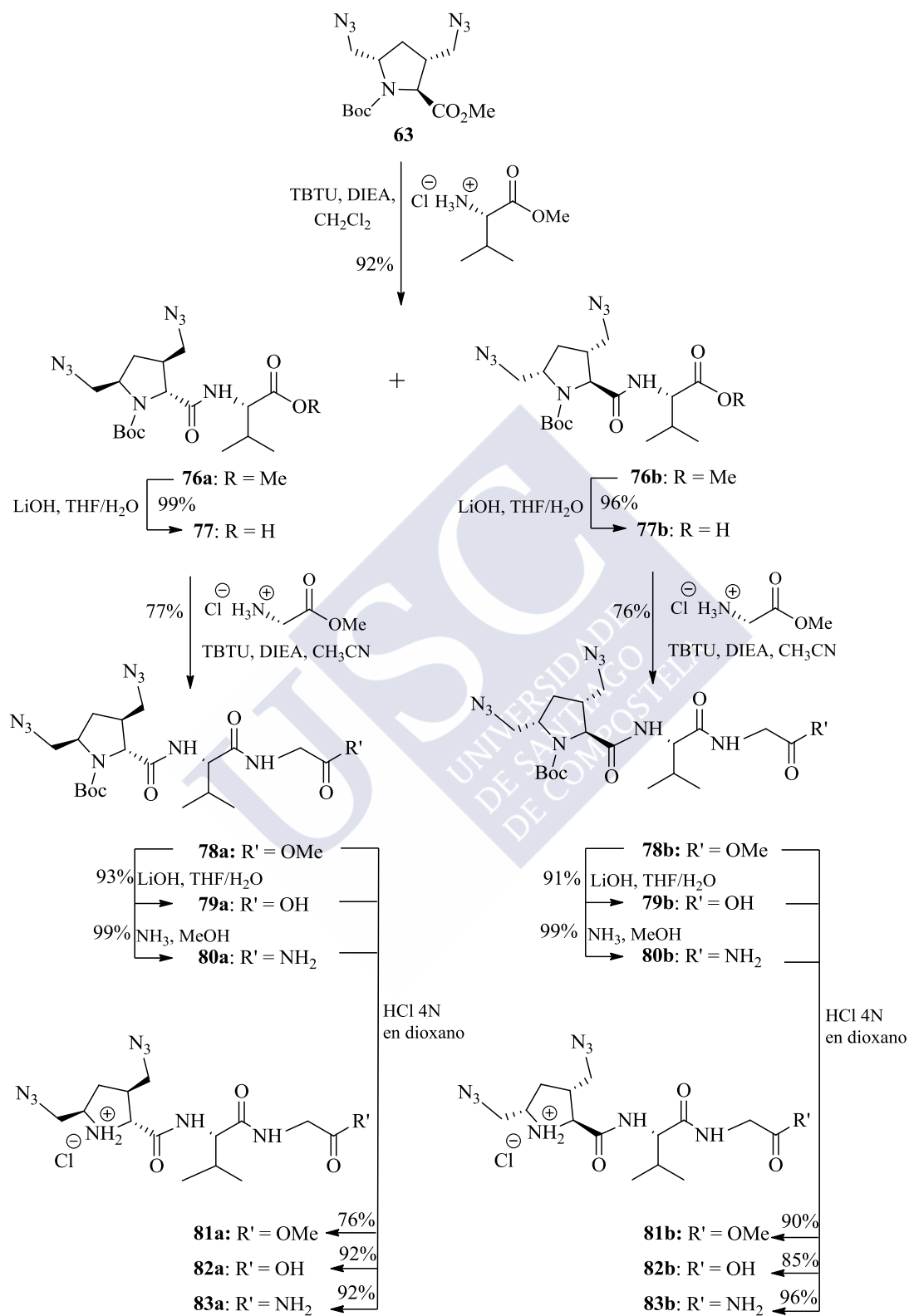
Figura 27. Diagrama ORTEP del compuesto **76a**.

En este caso la hidrólisis del compuesto **78b** con LiOH condujo a **79b** con un rendimiento del 91%, no presentando problemas derivados de la formación de productos secundarios al mantener el pH en el proceso de acidificación con H₂SO₄ 1M, en un valor no inferior a 5.

En un intento de valorar la conveniencia de desproteger estos derivados con HCl 4N en dioxano o TFA en CH₂Cl₂, se trató **78a** en estas últimas condiciones, resultando en este caso la sal **84a** con un rendimiento del 50%, inferior al alcanzado para el correspondiente clorhidrato **81a**, y además se encontraron mayores dificultades para su aislamiento.



³²⁶ Los datos cristalográficos del compuesto **76a** han sido depositados en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge como publicación privada CCDC 924408. Copias de estos datos pueden obtenerse libres de cargo en la aplicación del CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.



Esquema 43

De nuevo la eliminación del grupo *tert*-butiloxicarbonilo de los tripéptidos *N*-protegidos **78–80**, por tratamiento con HCl 4N en dioxano a temperatura ambiente condujo a los respectivos clorhidratos **81–83**.

Las disoluciones de la mayor parte de los dipéptidos y tripéptidos preparados en el desarrollo de la síntesis de los análogos de PLG que presentan en su estructura el grupo carbamato de *tert*-butilo muestran la presencia de rotámeros cuando se registran sus espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN.

Así los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN de los diastereoisómeros **66a** y **66b** exhiben ambos la presencia de por lo menos dos rotámeros mayoritarios en una proporción aproximada de 1:3, mientras que en los de los diastereoisómeros **76a** y **76b** la proporción aproximada es de 1:2, deducidas en ambos casos de la integración de las señales correspondientes al protón del grupo amida, tal como puede verse en el ejemplo indicado en la figura 28.

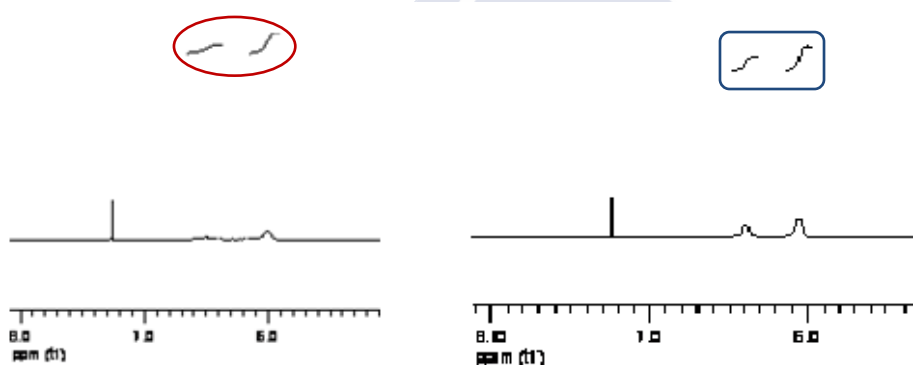


Figura 28. Señales de ^1H RMN correspondientes al protón del grupo amido de los diastereoisómeros **66a** y **76b**.

Otro ejemplo de ello lo encontramos en el ^{13}C RMN del compuesto **79a** (Figura 29), en el que destaca la duplicidad de la señal correspondiente al carbono cuaternario del radical *tert*-butilo a 82,30 ppm y 80,58 ppm, o de otras señales correspondientes a carbonos secundarios de la molécula, 54,51 ppm y 54,32 ppm para uno de ellos y 43,97 ppm y 43,89 ppm para otro.

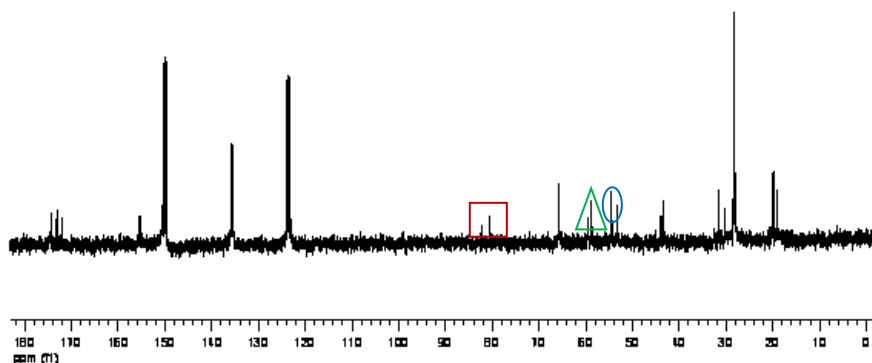


Figura 29. ^{13}C RMN del compuesto **79a**.

Sin embargo una vez desprotegido el nitrógeno amínico de la pirrolidina esta situación cambia, y en los clorhidratos **73a–75a**, **73b**, **75b**, **81a–83a** y **81b–83b** (véanse espectros, apartados 3.46–3.48, 3.53–3.54, 3.60–3.63 y 3.68–3.70) la complejidad de los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN disminuye en gran manera, por ello la existencia de un mayor número de rotámeros en las disoluciones de los compuestos **66–72** y **76–80**, se atribuye en gran parte a la libertad de giro alrededor del enlace carbamato.

Para hacer esta propuesta nos basamos en trabajos anteriores de diversos autores dedicados al estudio de aspectos conformacionales en dipéptidos o tripéptidos, en los que se demuestra que además de las dos posibles conformaciones (*cis-trans*) que pueden adoptar los derivados del anillo de la prolina (con frecuencia encontradas en estructuras de rayos X de péptidos^{327,328,329} y proteínas),^{330,331} los carbamatos, al presentar una unidad estructural similar a la de las amidas pero con un oxígeno adicional, cabe esperar que provoquen en los pequeños péptidos perturbaciones estructurales y electrónicas sobre la unidad de la amida y, como consecuencia de ello, las barreras de rotación en carbamatos suelen ser de 3–4 kcal/mol (~15–20%) más bajas que en las correspondientes amidas y por ello favorezcan la existencia de un mayor número de rotámeros.³³² Este hecho se atribuye a una menor interacción entre el par de electrones solitario del nitrógeno y el grupo carbonilo, ya que compite con la interacción entre el oxígeno del éster y el grupo carbonilo cuando la rotación sobre el enlace el C-N tiene lugar.³³³ Así, estudios realizados con *N*-metoxycarbonil-L-prolil-*N'*-metilamida, mostraron que el remplazamiento del grupo *N*-amida por el grupo *N*-carbamato trae como resultado cambios en las conformaciones preferentes.³³⁴

Estudios de la técnica de espectrometría de infrarrojo evidencian la presencia de rotámeros de péptidos en estado sólido.^{335,336} En nuestro caso encontramos un único ejemplo en el que se aprecia esta situación, así el espectro de infrarrojo de **78a** muestra claramente la duplicación de las señales de frecuencia correspondientes a las bandas de absorción de las vibraciones de tensión del enlace NH y del enlace C=O (Figura 30).

³²⁷ Momany, F. A.; McGuire, R. F.; Burgess, A. W.; Scheraga, H. A. *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 2361.

³²⁸ DeTar, D. F.; Luthra, N. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1232.

³²⁹ Madison, V. *Biopolymers* **1977**, *16*, 2671.

³³⁰ Pal, D.; Chakrabarti, P. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 271.

³³¹ Vitagliano, L.; Berisio, R.; Mastrangelo, A.; Mazzarella, L.; Zagari, A. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2627.

³³² Kang, Y. K.; Kang, S.N. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 1116.

³³³ (a) Drakenberg, T.; Dahlqvist, K.-I.; Forsen, S. *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 2178. (b) Eberhardt, E. S.; Loh, S. N.; Hinck, A. P.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5437.

³³⁴ Kang, Y. K.; Choi, H. Y. *Biophys. Chem.* **2004**, *111*, 135.

³³⁵ Deber, C. M. *Macromolecules* **1974**, *7*, 47.

³³⁶ Bures, P.W.; Ojala, W.H.; Gleason, W.B.; Johnson, R.L. *J. Peptide Res.* **1997**, *50*, 1.

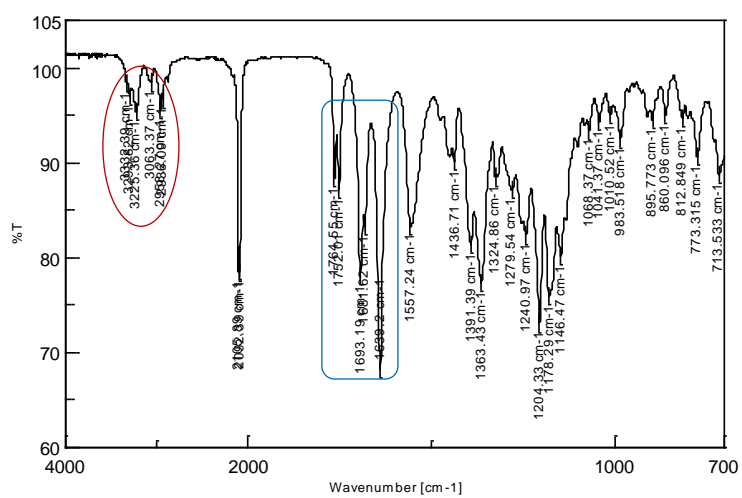


Figura 30. Espectro de IR del compuesto 78a.





3. PARTE EXPERIMENTAL



3.1. ASPECTOS GENERALES

a. Los puntos de fusión se determinaron en una platina KOFLER THERMOPAN REICHERT y no están corregidos.

b. Todos los compuestos fueron objeto de un estudio rutinario por espectrofotometría de IR empleando un espectrofotómetro PERKIN-ELMER 1640 FTIR, en película sobre NaCl (líquidos) o en pastillas de KBr (sólidos) o el espectrofotómetro JASCO FT/ IR-4100 provisto de un accesorio ATR (*Attenuated Total Reflection*, Reflexión Total Atenuada) para la aplicación de muestras. Se indican las bandas más intensas y características de cada compuesto expresando su número de onda (ν) en cm^{-1} .

c. Los espectros de RMN se registraron en aparatos Varian Mercury 300, Varian Inova 400 a 300 o 400 y 75 o 100 MHz, respectivamente, a temperatura ambiente en acetona, CDCl_3 , DMSO, TFA, piridina y D_2O , usando la señal del TMS o la del propio disolvente no totalmente deuterado como referencia interna.

Se indican los desplazamientos en ppm (escala δ), correspondientes a señales individuales bien resueltas o al intervalo en el que aparecen cuando corresponden a varias señales y/o a multipletes complejos, seguido de la multiplicidad de la señal (s = singlete; d = doblete; t = triplete; c = cuadruplete; quint = quintuplete; m = multiplete; dd = doblete de dobletes; ddd = doblete de dobletes de dobletes; dt = doblete de tripletes; dc = doblete de cuadrupletes; s an = señal ancha; ap = aparente), del número de protones (deducido de la integración), constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz) y de la asignación estructural cuando es clara.

d. Los espectros de masas con sistema de ionización por impacto electrónico (IE), ionización química (IQ) y los de bombardeo con átomos rápidos (BAR) se realizaron en un espectrómetro de masas MICROMASS AUTOSPEC, y los de ionización por electronebulización-tiempo de vuelo (IE-TDV), en un espectrómetro BRUKER Microtof.

e. Los datos de difracción de Rayos X se recogieron en difractómetros Bruker Kappa APEX II a baja temperatura (100 K).

f. Los microanálisis se realizaron en un analizador elemental Thermo Finnigan modelo Flash 1112.

g. Las actividades ópticas se midieron en un polarímetro PERKIN-ELMER 241, expresando la rotación específica en $(^\circ) (\text{dm})^{-1} (\text{g})^{-1} (\text{mL})$.

h. La separación de compuestos por cromatografía en columna se realizó empleando como adsorbente gel de sílice flash SDS tipo 60 A C.C., tamaño de partícula 35-70 micrones.

i. Para la realización de la cromatografía preparativa en capa fina se empleó como adsorbente gel de sílice 60 F₂₅₄ MERCK.

j. Para la realización de la cromatografía analítica en capa fina (CCF) se emplearon cromatofolios de gel de sílice TLC 60 F₂₅₄ MERCK de espesor de capa 0,2 mm, utilizando como reveladores luz UV (254-360 nm) y ácido fosfomolibdico.

k. Para las reacciones asistidas por microondas se utilizó u aparato de microondas CEM Discover SP.

l. Para las evaporaciones bajo presión reducida se utilizó un rotavapor RESONA 300 conectado a una trompa de agua.

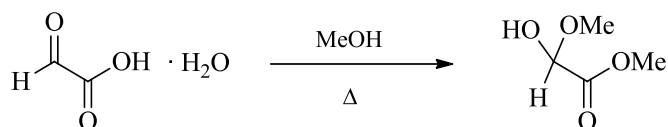
m. Para enfriar a temperaturas entre -60 °C y -78 °C, se emplearon baños de CO₂ o acetona/N₂ líquido.

n. Los disolventes utilizados se purificaron siguiendo los procedimientos descritos por Vogel³³⁷ y cuando se necesitaron anhidros, se secaron por destilación sobre un agente desecante adecuado, bajo atmósfera inerte de argón inmediatamente antes de ser utilizados.

Los agentes desecantes utilizados fueron: Na/benzofenona para THF, Et₂O, hexano, dioxano, y tolueno; presecado con CaO y después Mg/I₂ para el MeOH y EtOH; presecado con CaCl₂ anhidro y Mg/I₂ para el *n*-butanol; KOH para trietilamina y piridina; filtros moleculares para el *t*-BuOH y DMF y P₂O₅ para CH₂Cl₂ y CH₃CN.

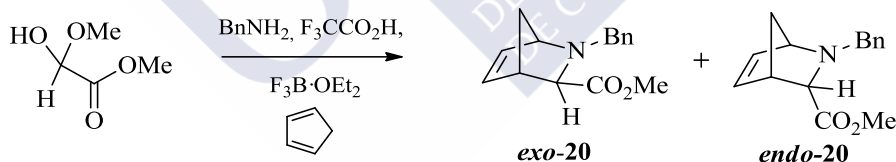
³³⁷ Vogel, A. I. *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed., Longman Scientific and Technical, London, **1989**, p. 395.

3.2. 2-Hidroxi-2-metoxiacetato de metilo



Una disolución de ácido glioxílico monohidratado (5,0 g, 54,0 mmol) en MeOH seco (27 mL) se reflujoó bajo atmósfera de argón durante 18 h. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, la disolución se neutralizó con KHCO_3 sólido, se eliminó parcialmente el MeOH por concentración a vacío y el residuo resultante se tomó en CH_2Cl_2 , se secó sobre Na_2SO_4 y los disolventes se eliminaron a sequedad, obteniéndose el 2-hidroxi-2-metoxiacetato de metilo (4,84 g, 74%) como un aceite incoloro, cuyas propiedades físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las descritas en la bibliografías.^{170c}

3.3. (±)-*exo*-(2-Bencil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno)-3-carboxilato de metilo (*exo*-20) y (±)-*endo*-(2-bencil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno)-3-carboxilato de metilo (*endo*-20)

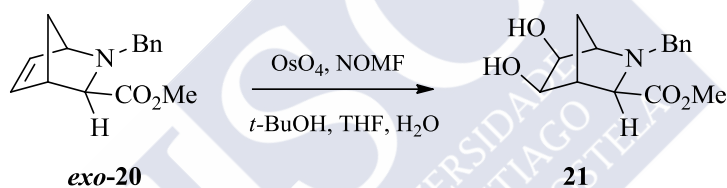


A una suspensión de 2-hidroxi-2-metoxiacetato de metilo (4,60 g, 38,30 mmol) y filtros moleculares de 3 Å en CH_2Cl_2 seco (95 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añadió lentamente, una disolución de BnNH_2 (6,66 mL, 61,03 mmol) en CH_2Cl_2 seco (41 mL) y la mezcla resultante se mantuvo con agitación durante 30 min. Tras enfriar la masa de reacción a -78 °C, se le añadieron sucesivamente, ácido trifluoroacético (4,69 mL, 61,03 mmol), trifluoroboroeterato (7,50 mL, 61,03 mmol) y ciclopentadieno recientemente destilado (10,10 mL, 121,94 mmol). Después de 6 h de agitación, y una vez alcanzada la temperatura ambiente, a la masa de reacción se le añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (100 mL) y NaHCO_3 sólido (9 g), tras lo cual se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtró sobre celita, y el sólido filtrado se lavó con CH_2Cl_2 y H_2O . El filtrado se extrajo con CH_2Cl_2 (3 × 100 mL) y la fase orgánica resultante se lavó

^{170c} Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10951.

sucesivamente con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (2×150 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (2×150 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a sequedad, rindiendo un residuo aceitoso marrón oscuro (10,50 g) que se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente hexano/ AcOEt (6:1). De la eliminación de los disolventes de las primeras fracciones que contenían producto se aisló **exo-20** (5,53 g, 59%) como un aceite amarillo claro, de las fracciones intermedias se separó una mezcla de **exo/endo-20** (0,72 g, 8%) y finalmente de las últimas fracciones **endo-20** (0,68 g, 7%) como un aceite amarillo oscuro. Ambos compuestos presentaron propiedades físicas y espectroscópicas coincidentes con las indicadas previamente en la bibliografía.^{170c}

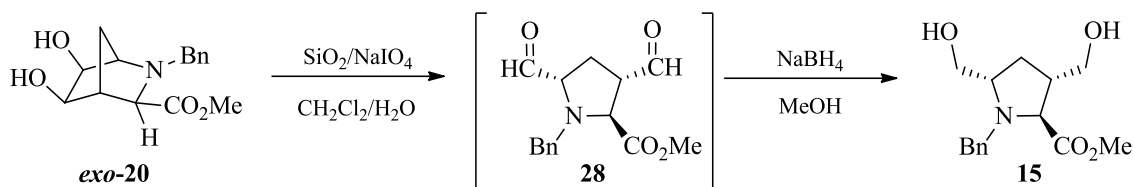
3.4. (\pm)-**exo**-(2-Bencil-5,6-dihidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptano)-3-carboxilato de metilo (**21**)



A una mezcla de **exo-20** (5,42 g, 22,28 mmol) y *N*-óxido de 4-metilmorfolina (2,30 mL, 22,28 mmol) se añadió una disolución acuosa de OsO_4 en H_2O al 4% (5 mL, 0,78 mmol), *t*-BuOH (42 mL), THF (65 mL) y H_2O (5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 h, tras las cuales se filtró sobre celita y el sólido filtrado se lavó repetidamente con THF. La eliminación los disolventes del filtrado a vacío, condujo a un aceite verde oscuro (7,03 g) que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando como eluyente hexano/ AcOEt (1:3). La concentración a sequedad de las fracciones que contenían producto condujo al diol **21** como un aceite amarillo (5,55 g, 90%), cuyas propiedades físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las descritas en la bibliografía.¹⁵⁷

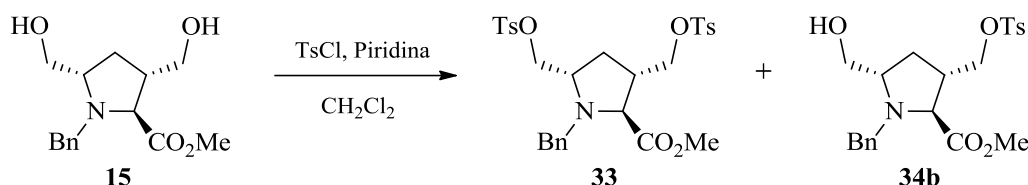
¹⁵⁷ Alves M. J.; García-Mera, X.; Vale, M. L. C.; Santos, T. P.; Aguiar, F. R.; Rodríguez-Borges, J. E.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7595.

3.5. (±)-(2*R**,3*S**,5*R**)-1-Bencil-3,5-bis(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**15**)



Sobre una suspensión de gel de sílice (39,0 g) en CH_2Cl_2 seco (230 mL) se añadió una disolución de NaIO_4 (5,65 g, 26,40 mmol) en H_2O (41 mL), la mezcla resultante, protegida de la luz mediante papel de aluminio, fue vigorosamente agitada hasta la aparición de un sólido de aspecto escamoso, añadiéndose entonces el diol **exo-20** (5,55 g, 20,31 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 seco (102 mL). La masa de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min, tras los cuales se le añadió Na_2SO_4 y se filtró; el sólido recogido se lavó varias veces con CH_2Cl_2 y el filtrado obtenido se concentró a sequedad, rindiendo un residuo aceitoso (5,22 g), sobre cuya disolución metanólica (39 mL de MeOH) se añadió en pequeñas porciones NaBH_4 (1,54 g, 40,62 mmol). Finalizada la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente 2 h, tras las cuales el MeOH se eliminó bajo presión reducida y se añadió H_2O (50 mL), la disolución acuosa resultante se extrajo con AcOEt (4×25 mL), el extracto orgánico se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se eliminó a vacío, rindiendo **15** (4,47 g, 79%) como un aceite amarillo claro, cuyas propiedades físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las descritas en la bibliografías.¹⁵⁷

3.6. (±)-(2*R,3*R**,5*R**)-1-Bencil-3,5-bis[[(*p*-tolilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (33) y (±)-(2*R**,3*R**,5*R**)-1-bencil-5-(hidroximetil)-3[[(*p*-tolilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (34b)**



A una disolución de **15** (1,24 g, 4,44 mmol) en CH₂Cl₂ seco (6 mL) y piridina seca (1,2 mL) enfriada mediante un baño de hielo y bajo atmósfera de argón, se añadió cloruro de tosilo (1,35 g, 7,10 mmol). La mezcla resultante se agito a temperatura ambiente 4 h, tras las cuales se diluyó con CH₂Cl₂ (40 mL); la fase orgánica se lavó sucesivamente con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 × 20 mL) y disolución acuosa saturada de NH₄Cl (2 × 20 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a presión reducida condujo a un residuo marrón aceitoso (1,85 g) que se fraccionó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (1:3) como eluyente. La eliminación del disolvente de las primeras fracciones que contenían producto condujo al derivado ditosilado **33** (0,56 g, 22%) y las segundas al derivado monotosilado **34b** (0,17 g, 9%).

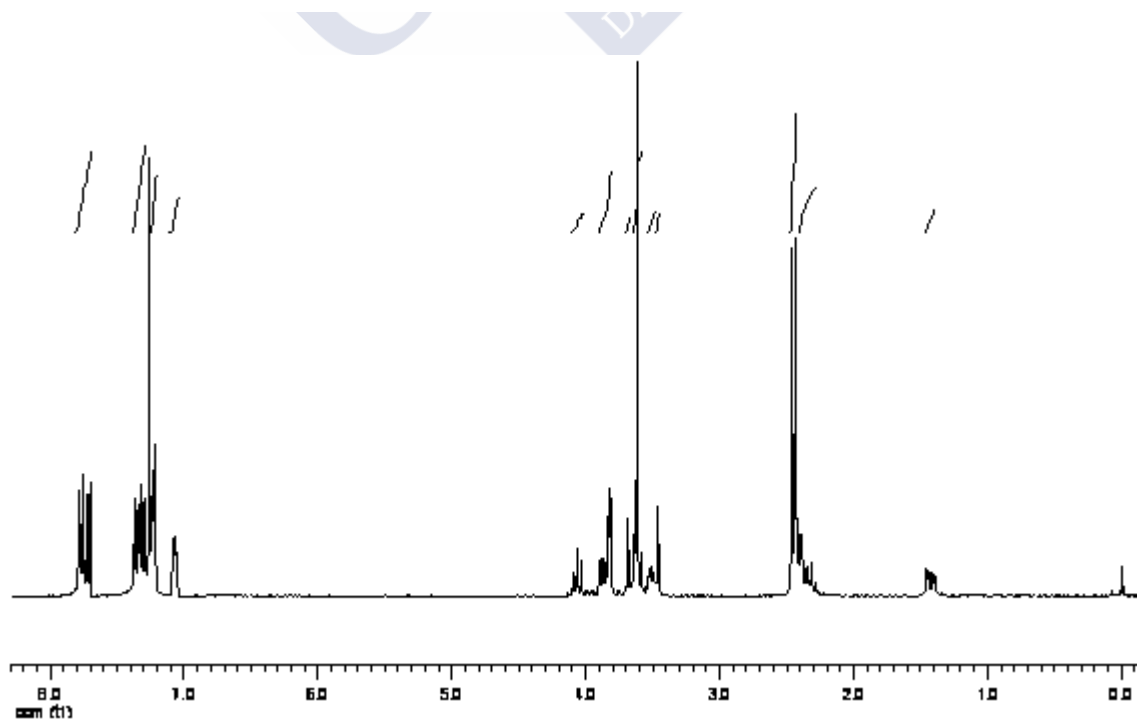
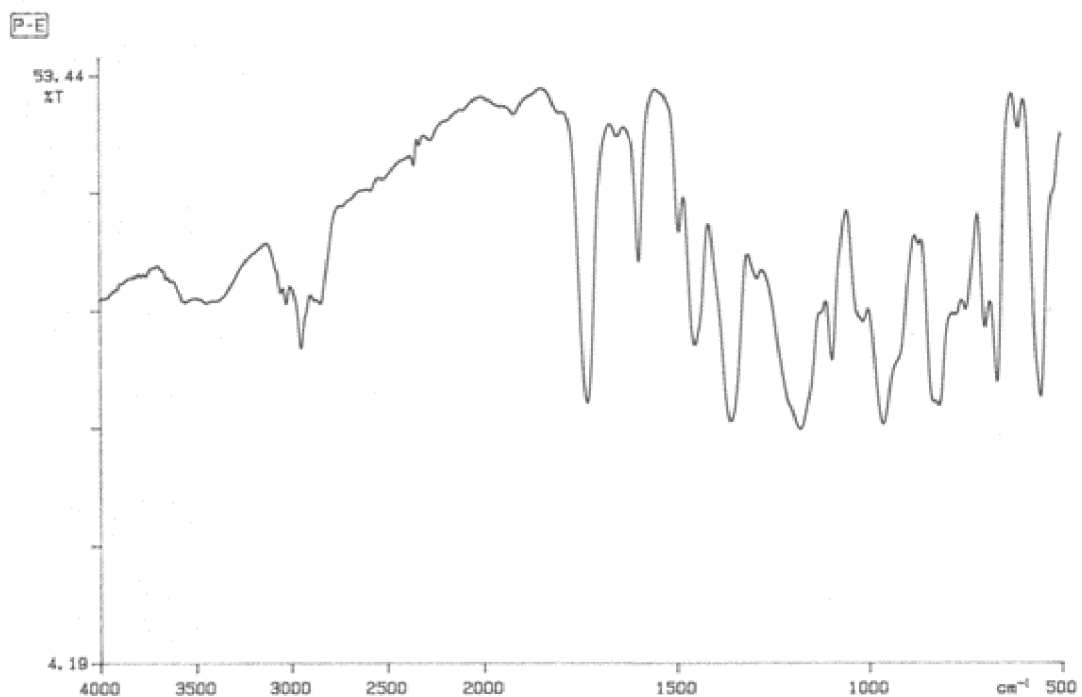
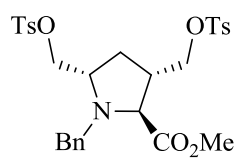
Compuesto **33**: aceite pardo.

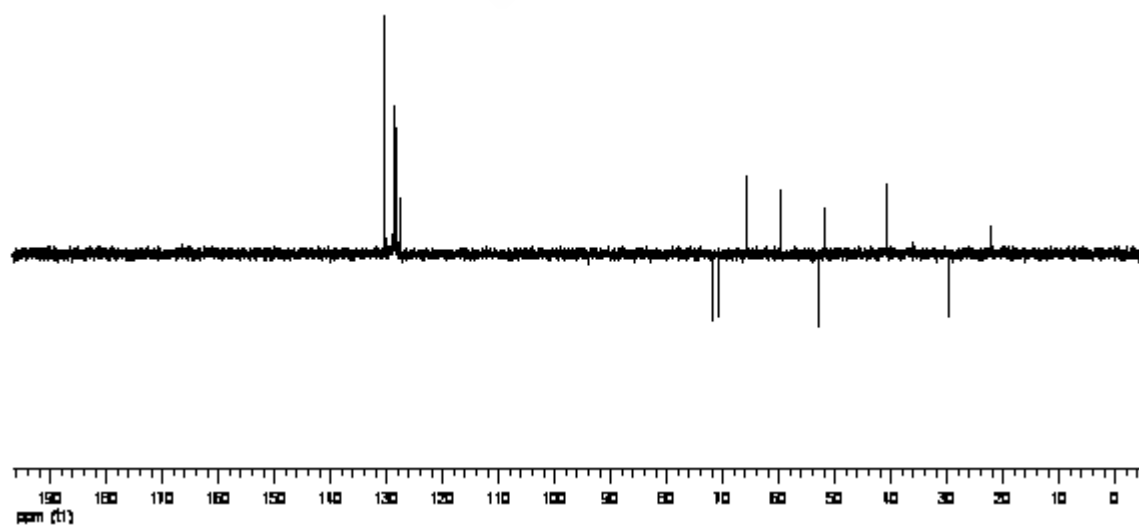
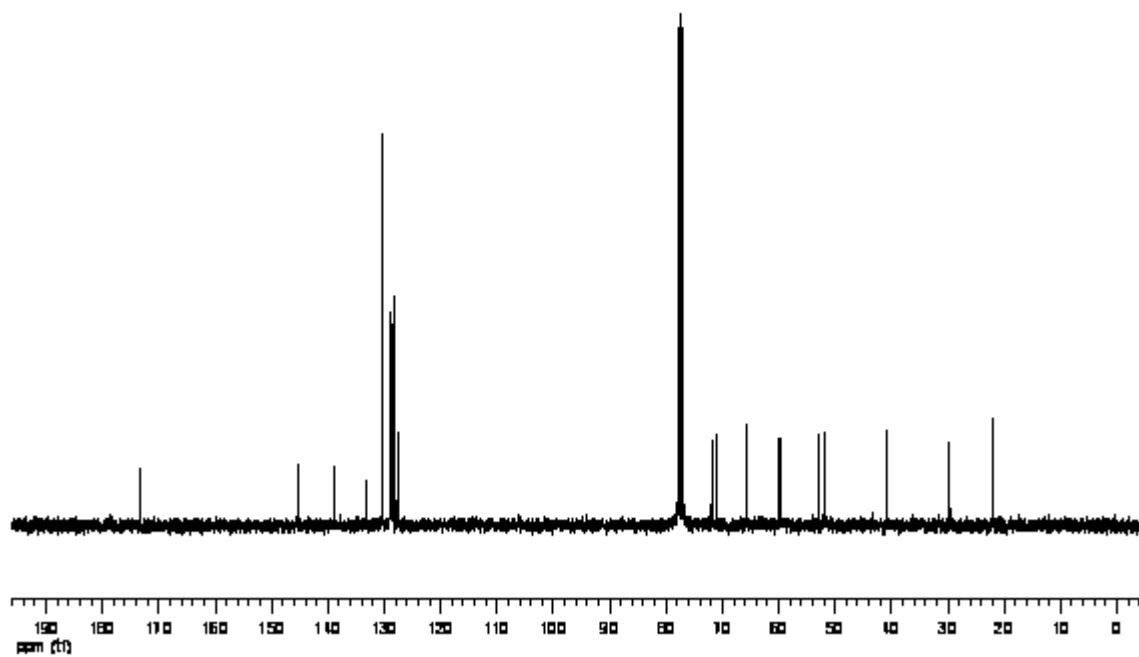
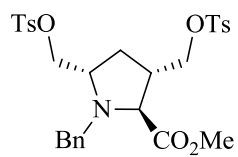
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3141, 2953, 1734, 1958, 1454, 1360, 1315, 1178, 1113, 1096, 964, 819, 667, 556.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,79-7,70 (m, 4H), 7,37-7,30 (m, 4H), 7,25-7,22 (m, 3H), 7,08-7,05 (m, 2H), 4,09-4,03 (m, 1H), 3,90-3,82 (m, 3H), 3,69-3,64 (m, 1H), 3,65-3,58 (m, 1H), 3,61 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,53-3,49 (m, 1H), 3,47-3,44 (m, 1H), 2,46 (s, 3H, CH₃-Ph), 2,44 (s, 3H, CH₃-Ph), 2,42-2,28 (m, 2H, 2-H y 4-HH), 1,45-1,39 (m, 1H, 4-HH).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,13 (C), 145,26 (C), 138,76 (C), 138,73 (C), 133,06 (C), 133,03 (C), 130,34 (CH), 128,77 (CH), 128,54 (CH), 128,25 (CH), 127,73 (CH), 71,89 (CH₂), 70,90 (CH₂), 65,69 (CH), 59,83 (CH), 52,01 (CH₂), 51,83 (CH₃), 40,71 (CH), 29,71 (CH₂), 22,09 (CH₃), 22,06 (CH₃).

EM-AR m/z : calculado para C₂₉H₃₃NO₈S₂, 587,1648; encontrado, 587,1665.





Compuesto **34b**: aceite pardo.

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 3418, 2955, 2860, 1741, 1456, 1173, 1119, 679.

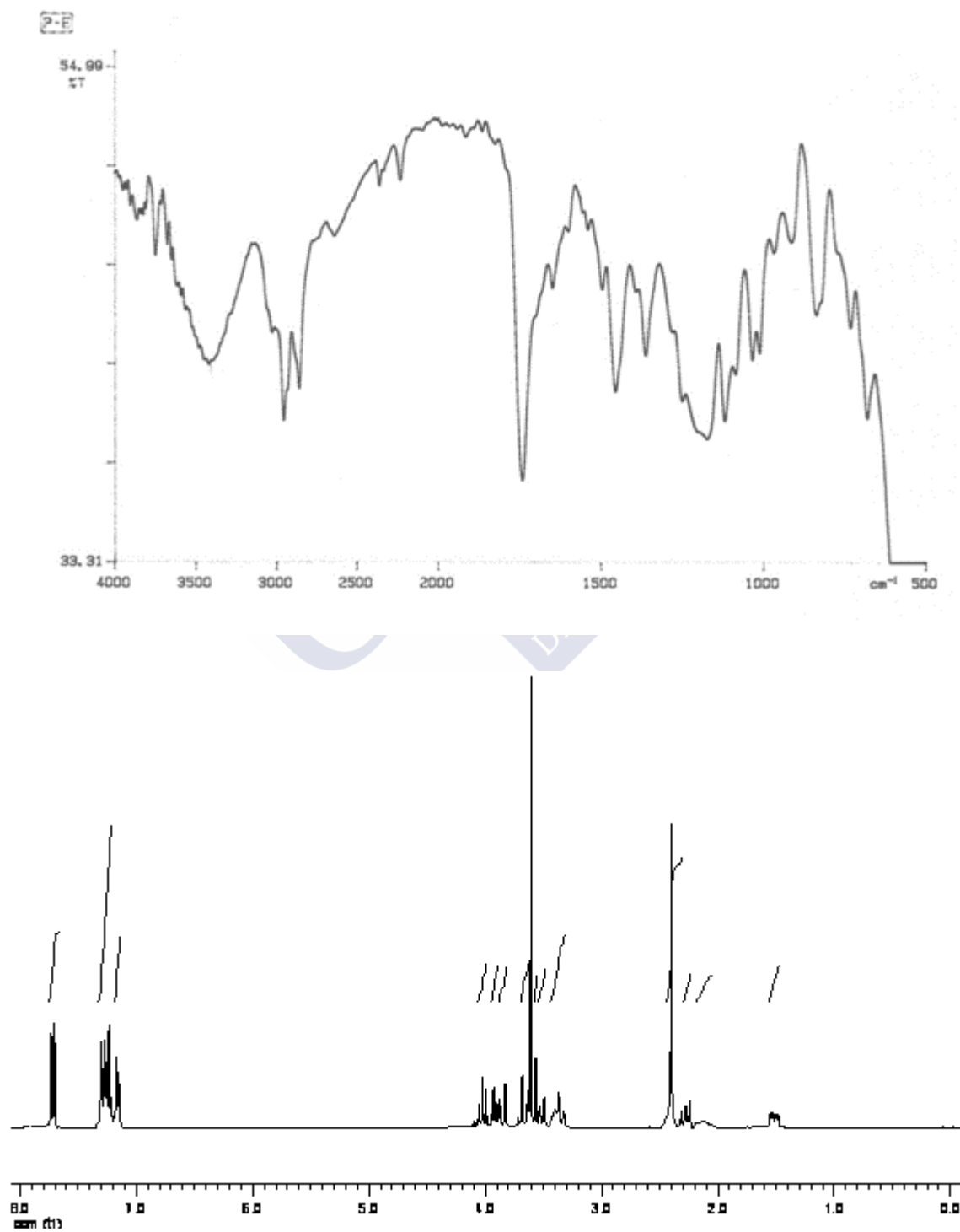
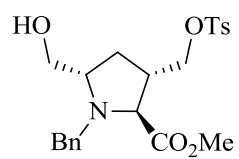
^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 7,73-7,70 (m, 2H), 7,30-7,19 (m, 5H), 7,17-7,14 (m, 2H), 4,05-3,99 (m, 1H), 3,92 (dd, $J = 9,6, 6,0$ Hz, 1H), 3,85 (d, $J = 13,9$ Hz, 1H, PhCHH), 3,64 (d, $J = 13,9$ Hz, 1H, PhCHH), 3,63-3,56 (m, 1H), 3,61 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,52 (dd, $J = 11,3, 3,3$ Hz, 1H), 3,41-3,33 (m, 2H), 2,43 (m, 1H), 2,40 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ph}$), 2,26 (dd, $J = 9,2, 4,2$ Hz, 1H, 4-HH), 2,11 (s an, 1H, intercambia con D_2O , OH), 1,52 (ddd, $J = 13,3, 5,8, 3,1$ Hz, 1H, 4-HH).

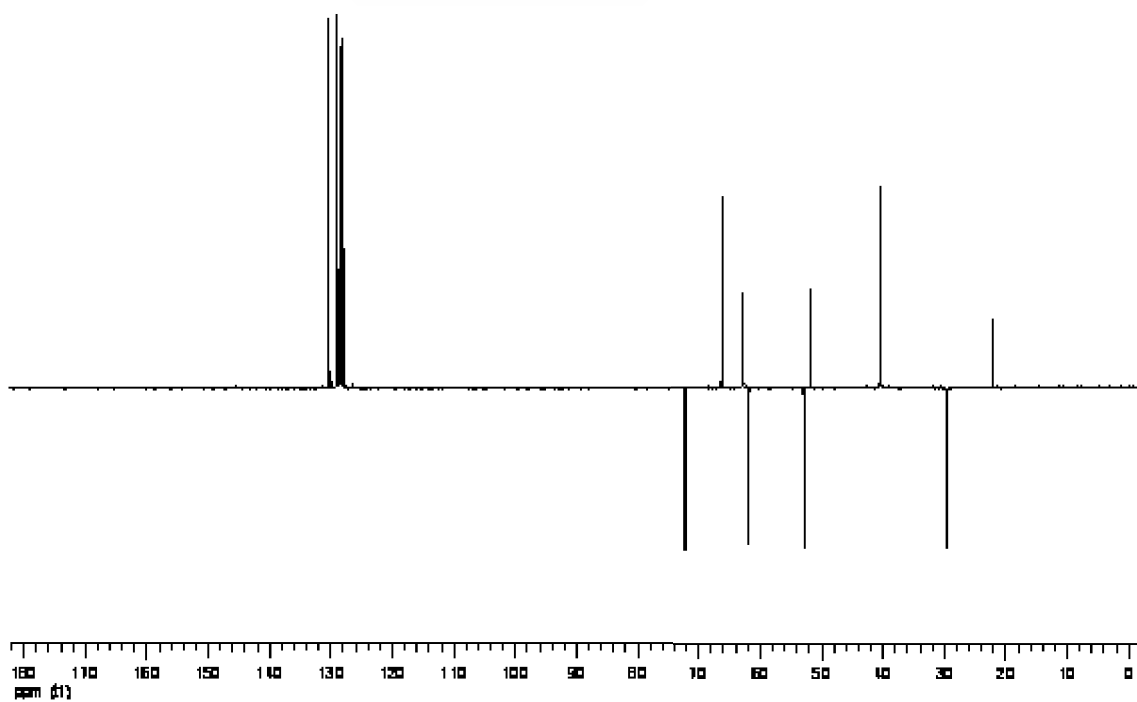
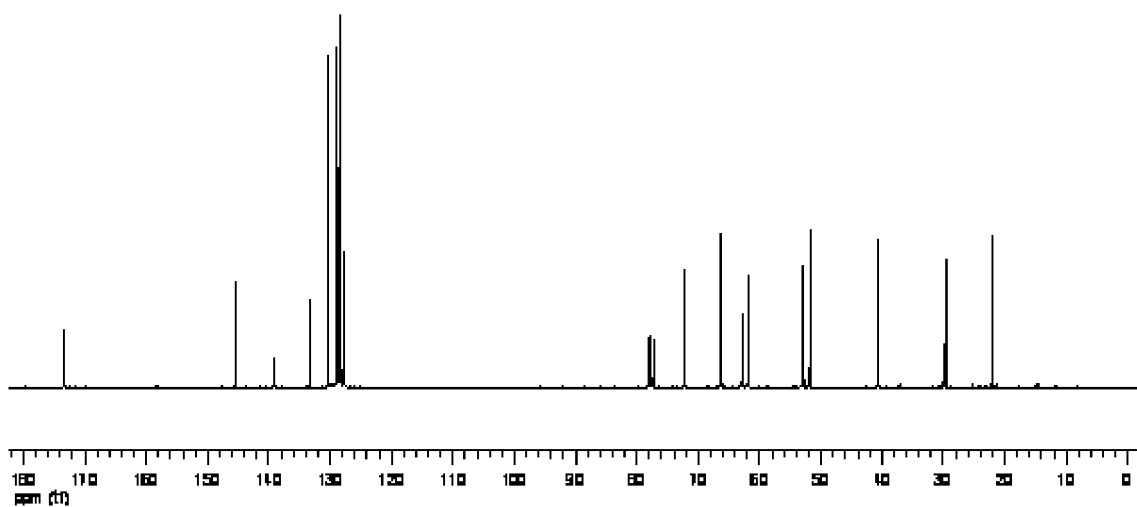
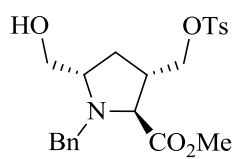
^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 173,42 (C), 145,29 (C), 139,19 (C), 133,27 (C), 130,30 (CH), 128,96 (CH), 128,53 (CH), 128,26 (CH), 127,73 (CH), 72,16 (CH_2), 66,24 (CH), 62,83 (CH), 61,83 (CH_2), 52,84 (CH_2), 51,78 (CH_3), 40,43 (CH), 29,58 (CH_2), 22,02 (CH_3).

EM-BAR m/z (%): 434 $[(M + 1)^+, 100]$.

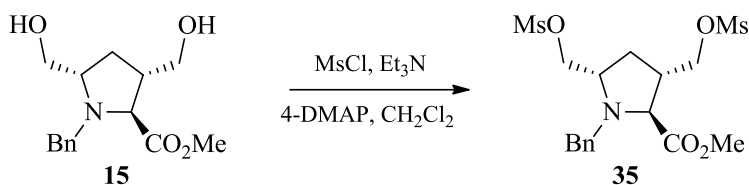
EM-AR m/z : calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{S}$, 433,1559; encontrado, 433,1578.

Parte Experimental





3.7. (±)-(2*R,3*R**,5*R**)-1-Bencil-3,5-bis[[[(metilsulfonil)oxi]metil]]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (35)**



A una disolución de **15** (0,30 g, 1,07 mmol), Et₃N seca (225 µL) y una cantidad catalítica de 4-DMAP en CH₂Cl₂ seco (10 mL) enfriada en un baño de hielo y bajo atmósfera de argón, se añadió gota a gota (aproximadamente durante 5 min) MsCl (250 µL, 3,22 mmol). La mezcla resultante fue agitada a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida (aproximadamente 1 h, CCF). A continuación se diluyó con CH₂Cl₂ (70 mL) y la fase orgánica se lavó sucesivamente con disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 × 20 mL), H₂O (2 × 20 mL) y disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a presión reducida condujo a un residuo amarillo aceitoso (0,43 g) que se fraccionó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (1:1) como eluyente. La eliminación de disolvente de las fracciones que contenían producto, condujo a **35** (0,30 g, 64%) como un aceite amarillo.

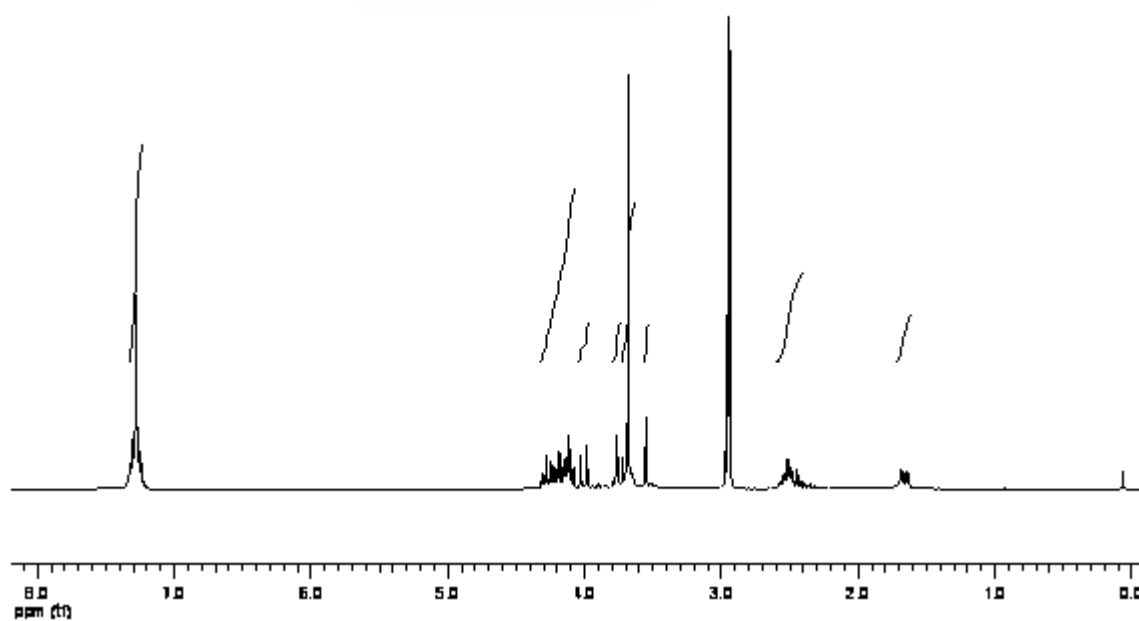
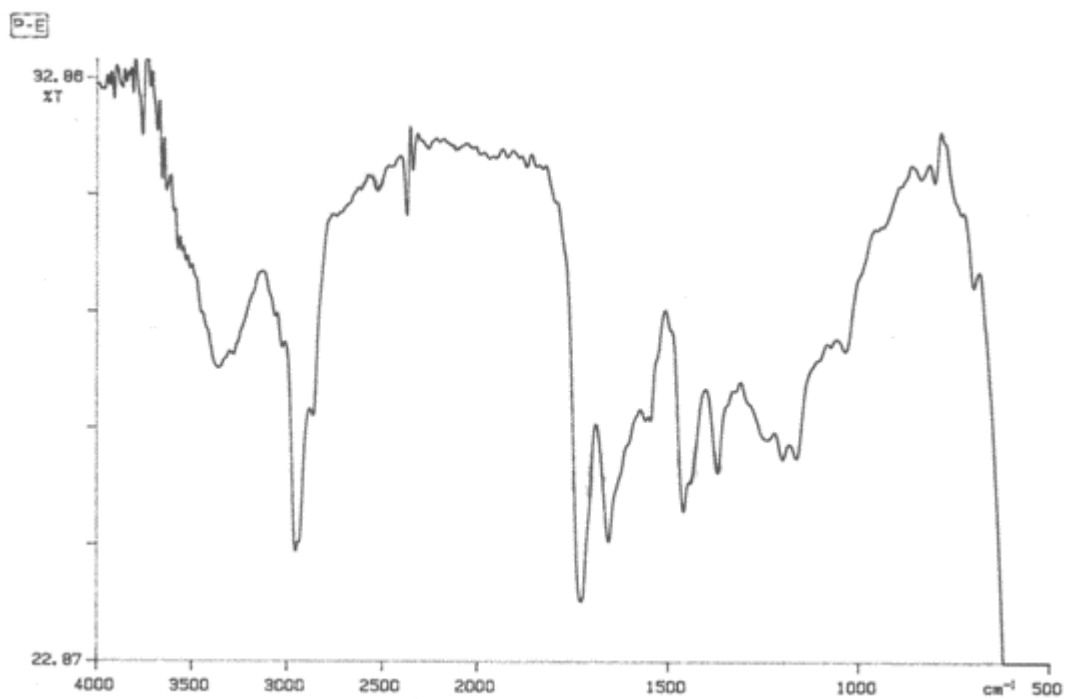
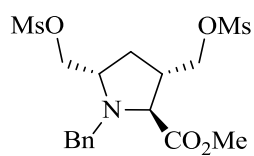
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3346, 2954, 1726, 1655, 1459, 1170.

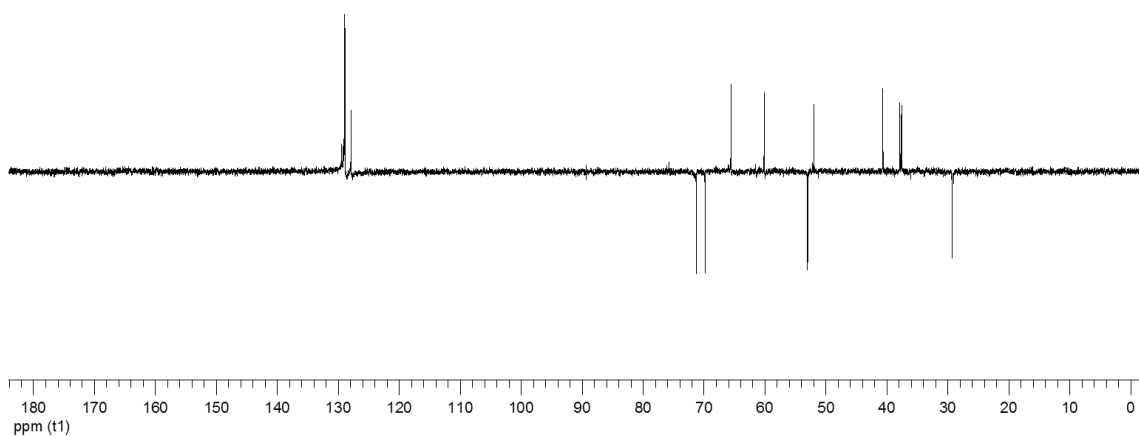
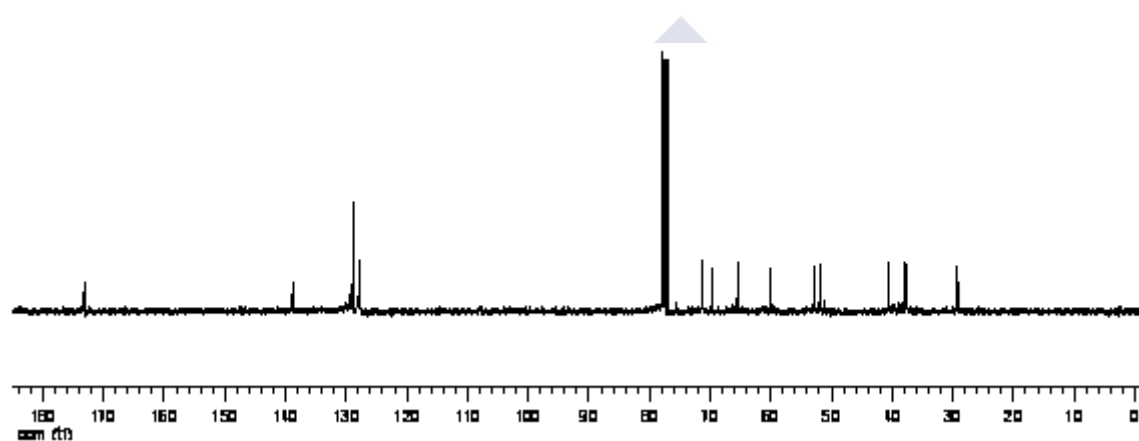
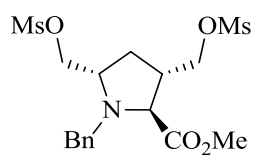
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,32-7,21 (m, 5H), 4,31-4,07 (m, 4H, 2 OCH₂), 4,0 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), 3,80-3,72 (m, H), 3,75-3,64 (m, 1H), 3,68 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,56-3,53 (m, 1H), 2,95 (s, 3H, SO₂CH₃), 2,93 (s, 3H, SO₂CH₃), 2,57-2,41 (m, 2H, 3-H y 4-HH), 1,69-1,63 (m, 1H, 4-HH).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,23 (C), 138,88 (C), 129,40 (CH), 128,92 (CH), 128,81 (CH), 127,98 (CH), 127,86 (CH), 71,25 (CH₂), 69,79 (CH₂), 65,56 (CH), 60,10 (CH), 52,98 (CH₂), 51,96 (CH₃), 40,64 (CH), 37,86 (CH₃), 37,57 (CH₃), 29,26 (CH₂).

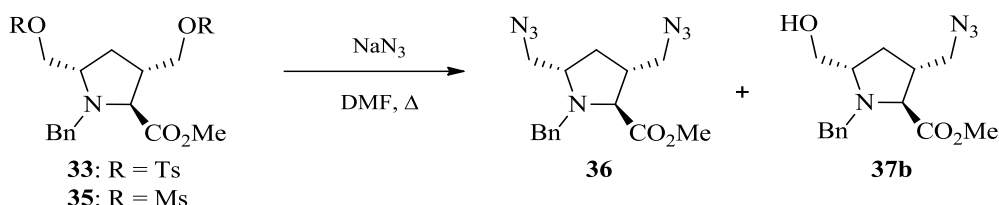
EM-IE-TDV *m/z* (%): 358 [(M⁺ - Ph), 100].

EM-AR *m/z*: calculado para C₁₇H₂₅NO₈S₂, 435,1022; encontrado, 435,1039.





3.8. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-Bis(azidometil)-1-bencilpirrolidina-2-carboxilato de metilo (36) y (±)-(2*R**,3*S**,5*R**)-3-(azidometil)-1-bencil-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (37b)**



3.8.1. Método A

Sobre una disolución de **33** (0,20 g, 0,34 mmol) en DMF seca (11 mL) bajo atmósfera de argón se añadió NaN_3 (0,22 g, 3,40 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 14 h. La eliminación de la DMF bajo presión reducida condujo a un residuo que se repartió entre H_2O (100 mL) y Et_2O (50 mL). La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 × 25 mL), las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaCl (25 mL) y se secaron sobre Na_2SO_4 . La eliminación del disolvente bajo presión reducida aportó un aceite amarillo (0,11 g) que se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt (6:1), que tras la eliminación del disolvente permitió aislar **36** (0,06 g, 54%) como un sólido blanquecino, p.f. = 75–78 °C.

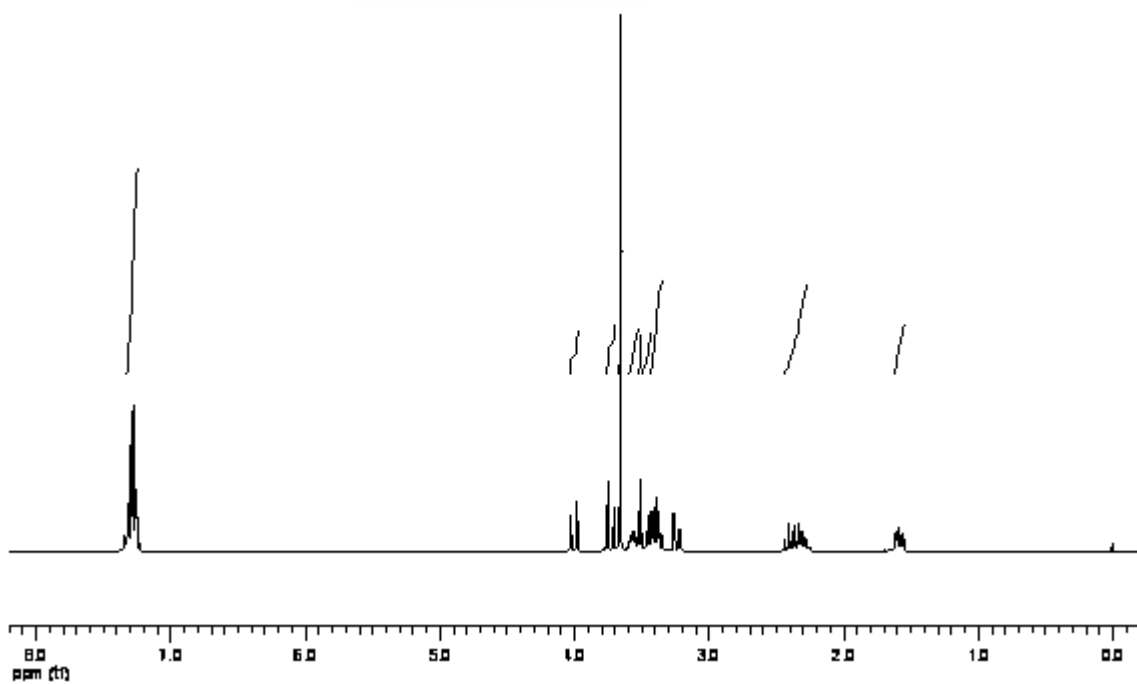
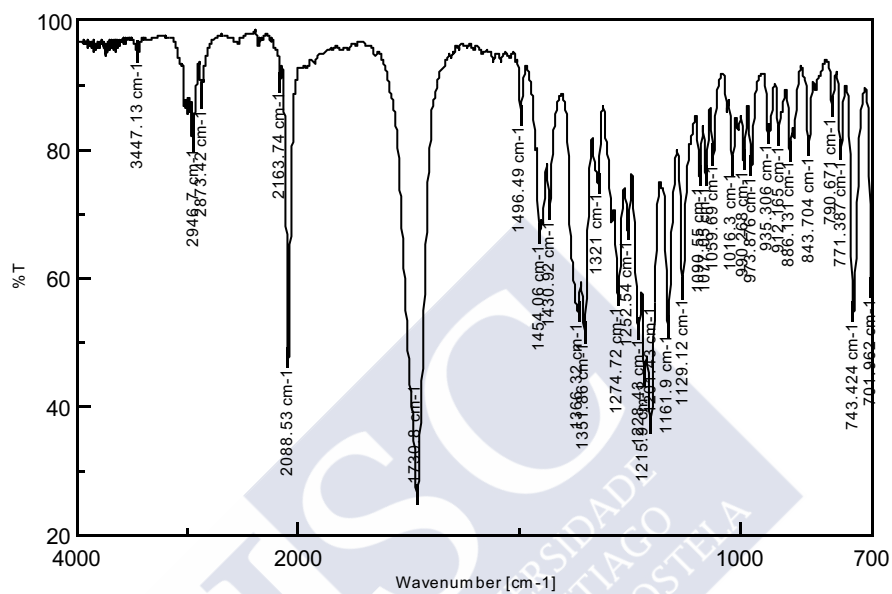
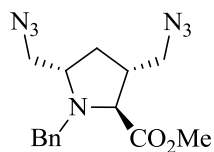
IR v (cm^{-1}): 3447, 2947, 2873, 2088, 1731, 1454, 1351, 1201, 1162, 1129.

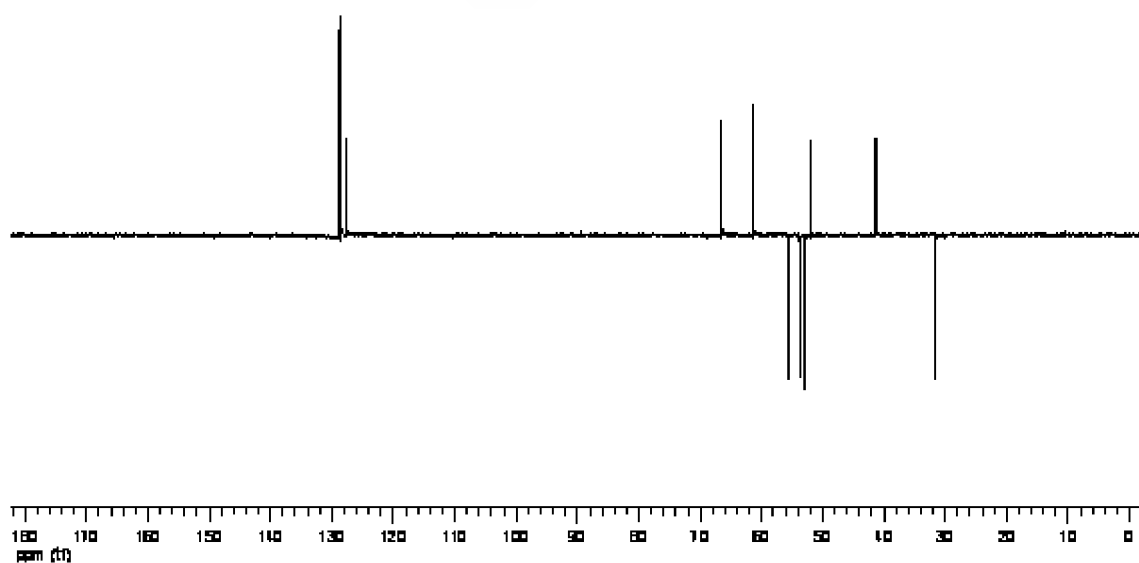
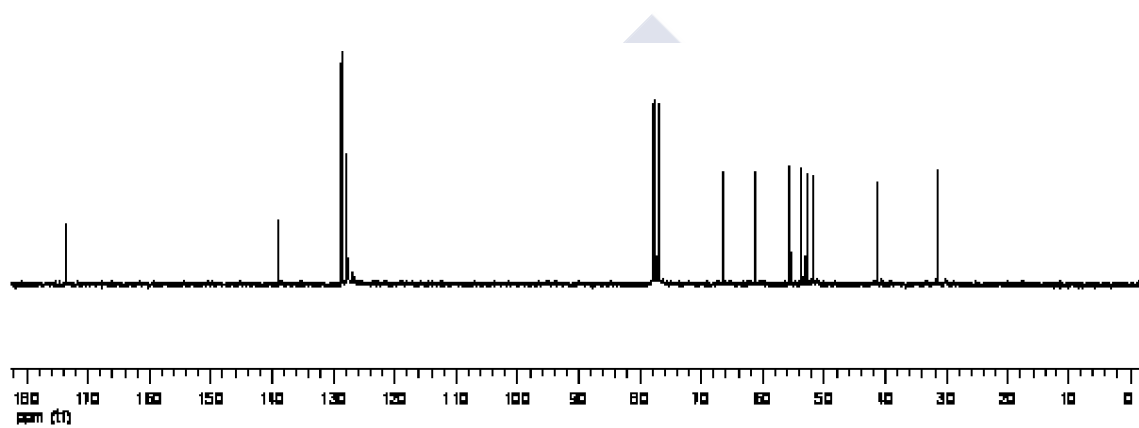
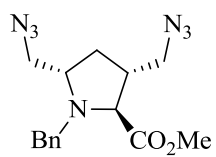
^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 7,35-7,25 (m, 5H), 4,0 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H), 3,73 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H), 3,66 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,59-3,53 (m, 1H), 3,51-3,43 (m, 2H), 3,41-3,35 (m, 1H), 3,40 y 3,24 (parte AB sistema ABM, $J = 12,8, 3,2$ Hz, 2H, PhCH_2), 2,44-2,28 (m, 2H, 2-H y 4-HH), 1,62-1,55 (m, 1H, 4-HH).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 173,70 (C), 138,94 (C), 128,91 (CH), 128,69 (CH), 127,75 (CH), 66,50 (CH), 61,30 (CH), 55,53 (CH_2), 53,66 (CH_2), 52,87 (CH_2), 51,79 (CH_3), 41,28 (CH), 31,59 (CH_2).

EM-IE-TVD m/z (%): 330 [$(\text{M} + 1)^+$, 100].

Microanálisis. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_2$ (329,36): C 54,70, H 5,81, N 29,77. Encontrado: C 55,01, H 5,72, N 29,95.





3.8.2. Método B

Se utilizó un método similar al arriba descrito pero utilizando como producto de partida el compuesto **35** (1,13 g, 2,59 mmol). La purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente hexano/AcOEt (8:1), condujo a **36** (0,35 g, 41%) tras eliminar el disolvente de las primeras fracciones que contenían producto, cuyos datos físicos y espectroscópicos resultaron idénticos a los del compuesto obtenido por el método A. La eliminación del disolvente de un segundo grupo de fracciones permitió aislar el compuesto **37b** (0,10 g, 13%) como un aceite amarillo.

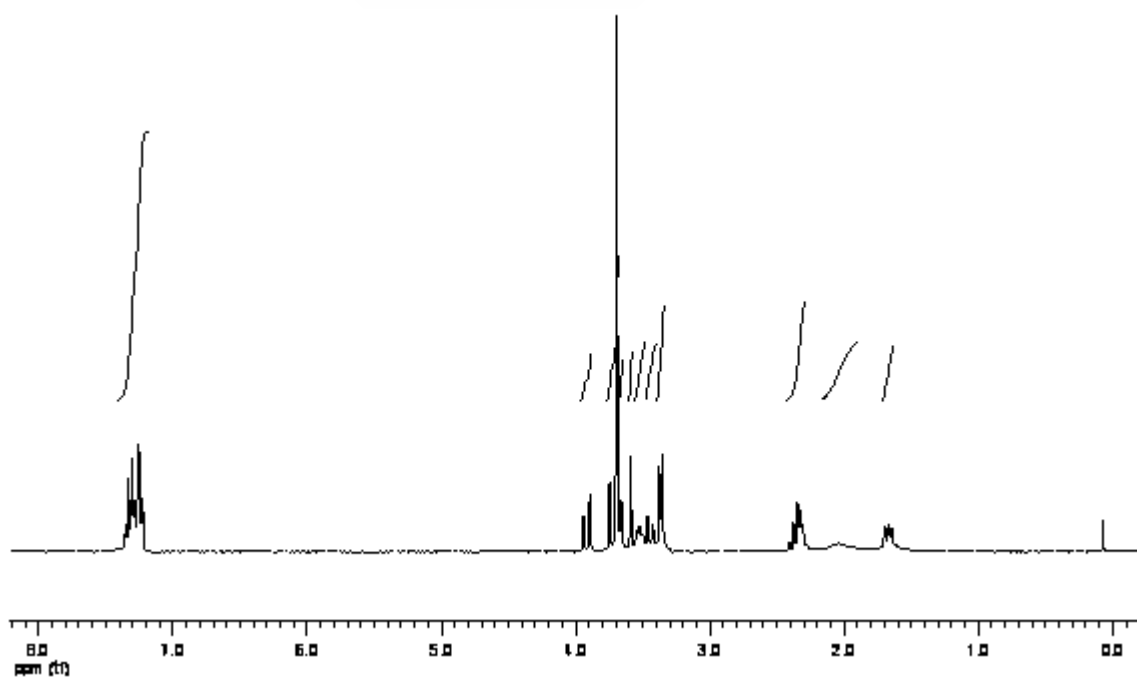
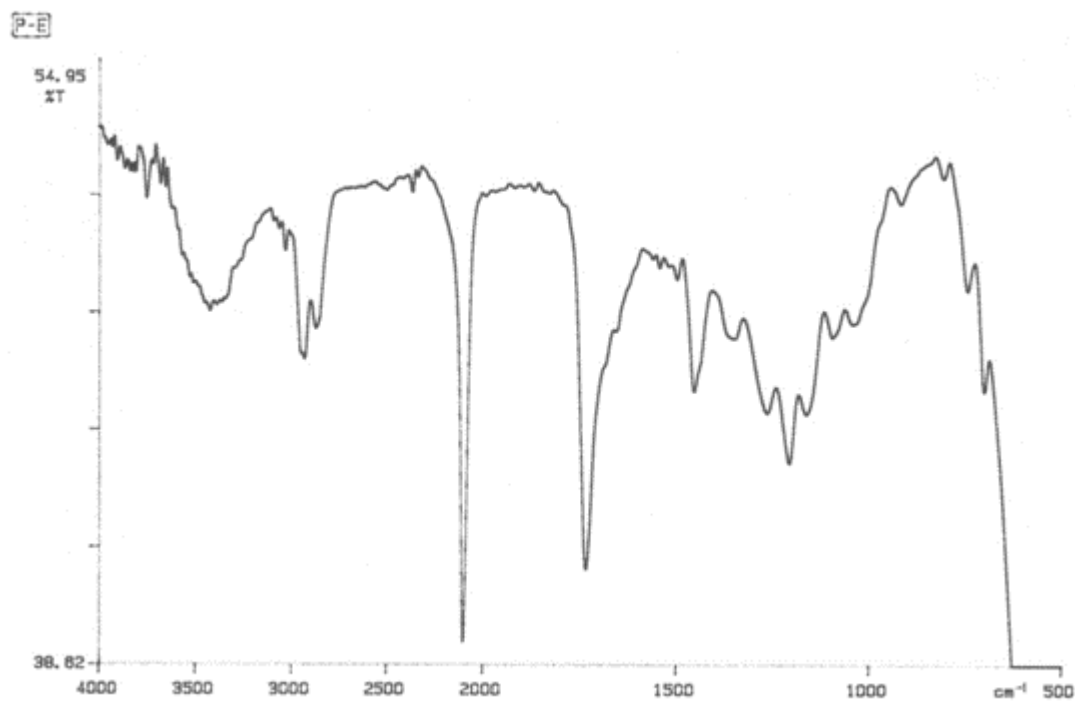
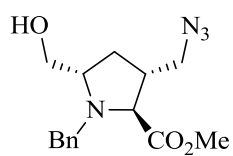
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3419, 2929, 2100, 1733, 1452, 1205.

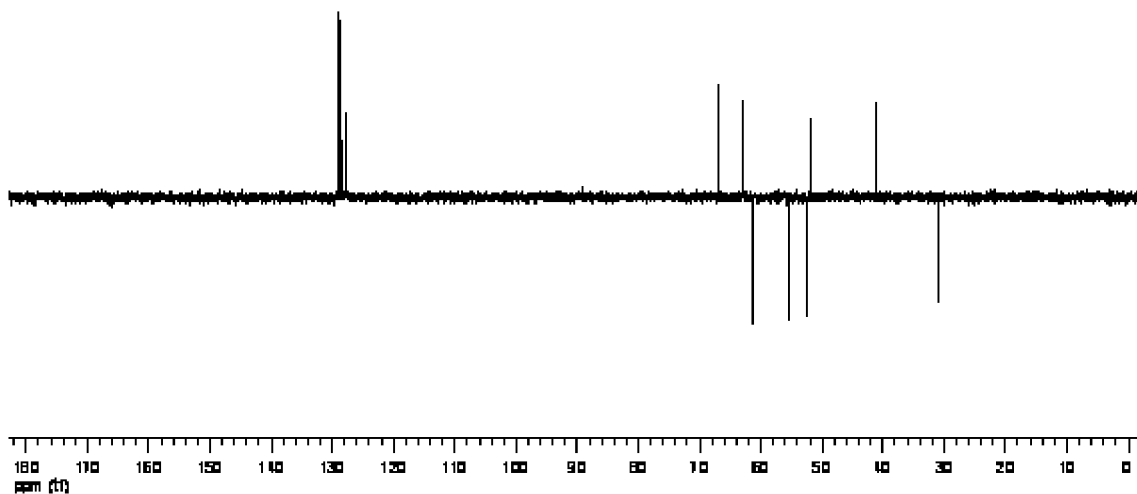
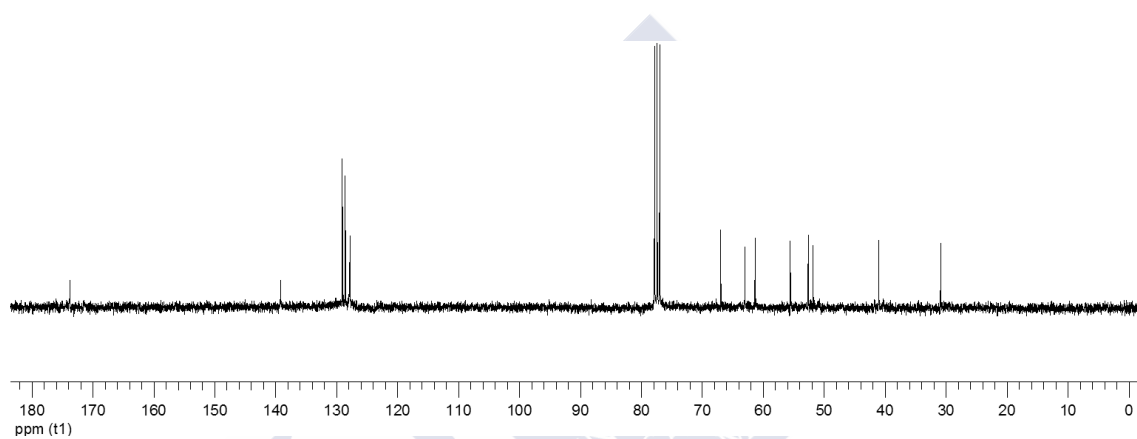
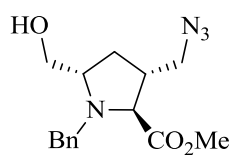
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,36-7,23 (m, 5H), 3,92 (d J = 13,7, Hz, 1H), 3,74 (m, 1H), 3,69 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,66 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 3,59-3,56 (m, 1H), 3,55-3,50 (m, 1H), 3,46-3,44 (m, 1H), 3,38-3,35 (m, 2H), 2,41-2,30 (m, 2H, 2-H y 4-HH), 2,11 (s an, 1H, intercambia con D₂O, OH), 1,69-1,64 (m, 1H, 4-HH).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 174,06 (C), 138,19 (C), 129,08 (CH), 128,59 (CH), 127,85 (CH), 66,97 (CH), 63,05 (CH), 61,37 (CH₂), 55,57 (CH₂), 52,63 (CH₂), 51,84 (CH₃), 41,05 (CH), 30,91 (CH₂).

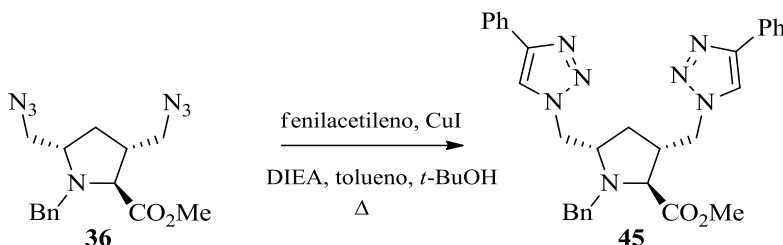
EM-IE-TVD m/z (%): 305 [(M + 1)⁺, 100].

EM-AR m/z : calculado para C₁₅H₂₀N₄O₃, 304,1535; encontrado, 304,1552.





3.9. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-Bencil-3,5-bis[(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**45**)**



Sobre una disolución de **36** (0,31 g, 1,02 mmol) en tolueno (4,2 mL) y *t*-BuOH (1,2 mL), bajo atmósfera de argón, se añadió fenilacetileno (0,25 g, 2,44 mmol), CuI (0,09 g, 0,043 mmol) y DIEA (0,26 g, 2,04 mmol). Después de 18 h de agitación a 70 °C se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el residuo resultante se disolvió en AcOEt (50 mL). La disolución resultante se lavó con H₂O (2 × 25 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a sequedad condujo a **45** (0,29 g, 54%) como un sólido blanco, p.f. = 140–142 °C.

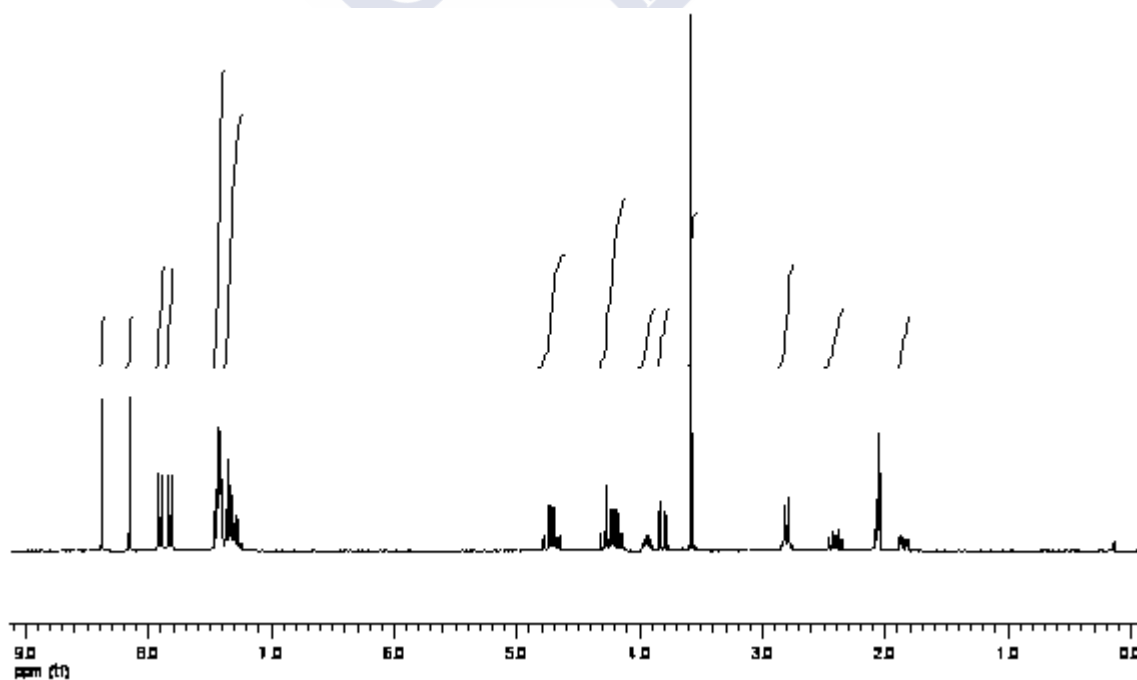
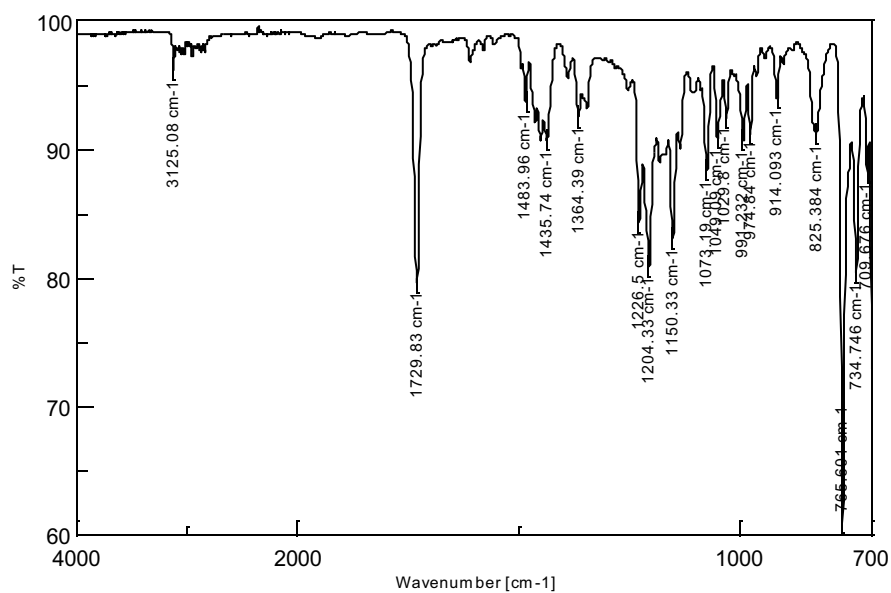
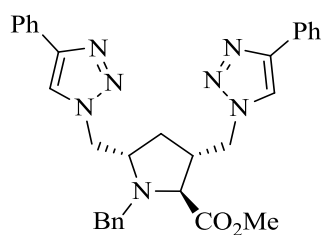
IR ν (cm⁻¹): 3125, 1730, 1484, 1436, 1364, 1226, 1204, 1150, 1073, 765, 735, 710.

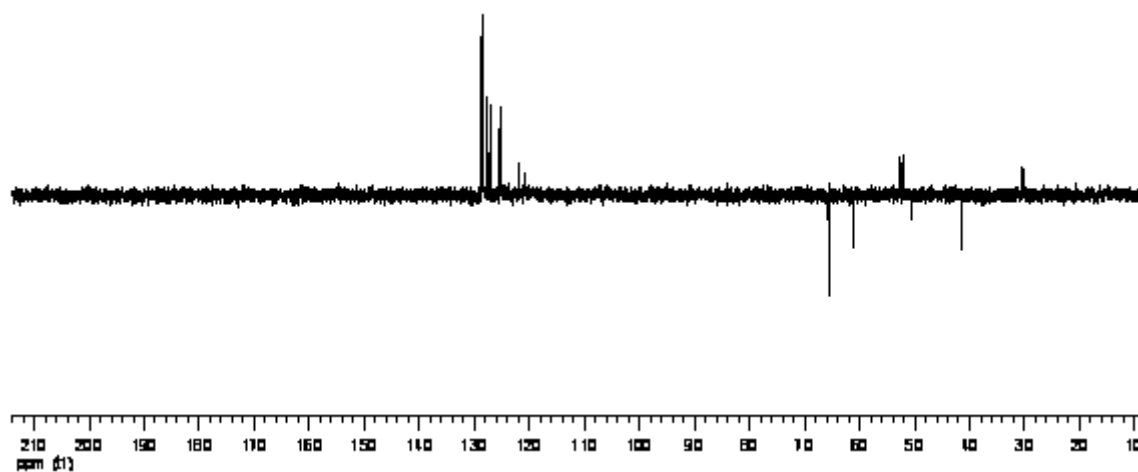
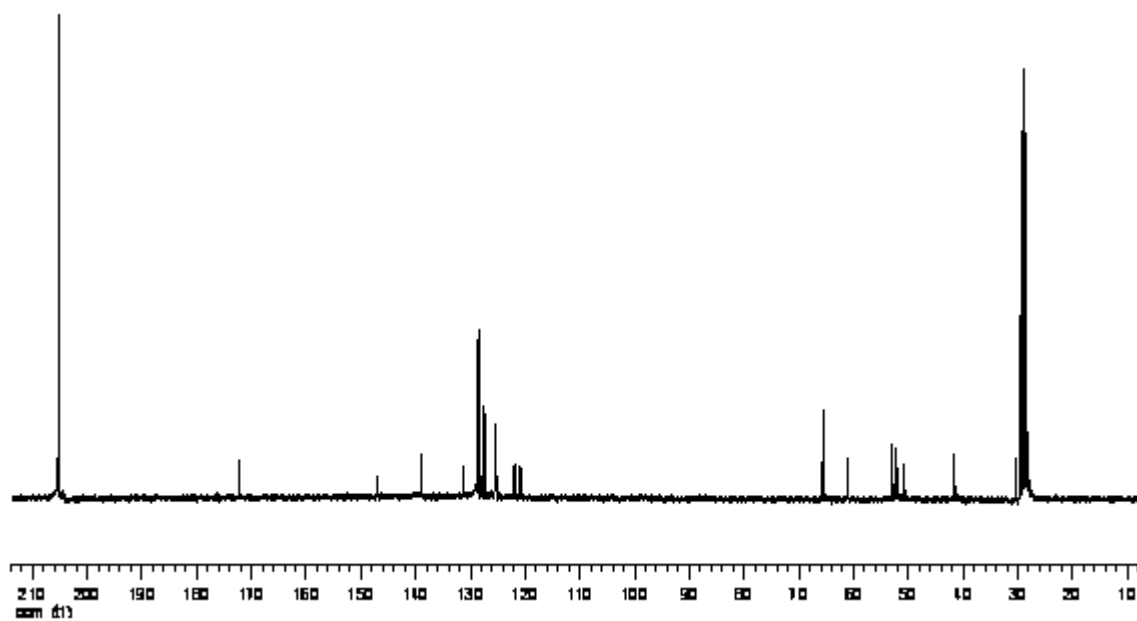
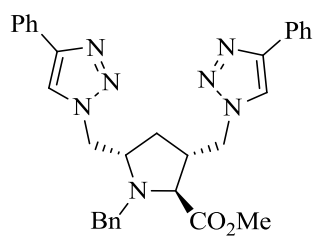
¹H RMN (acetona-*d*₆) δ (ppm): 8,38 y 8,15 (2s, 2H, 5-*H*_{triazol} y 5'-*H*_{triazol}), 7,92-7,88 (m, 2H), 7,80-7,78 (m, 2H), 7,46-7,39 (m, 6H), 7,37-7,24 (m, 5H), 4,78-4,64 (m, 2H), 4,31-4,13 (m, 3H), 3,94 (dd, *J* = 10,1, 4,7 Hz, 1H), 3,81 (d, *J* = 13,8 Hz, 1H), 3,57 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,82-2,79 (m, 2H), 2,40 (dt, *J* = 13,9, 9,2 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,84 (ddd, *J* = 7,1, 5,1, 4,7 Hz, 1H, 4-*HH*).

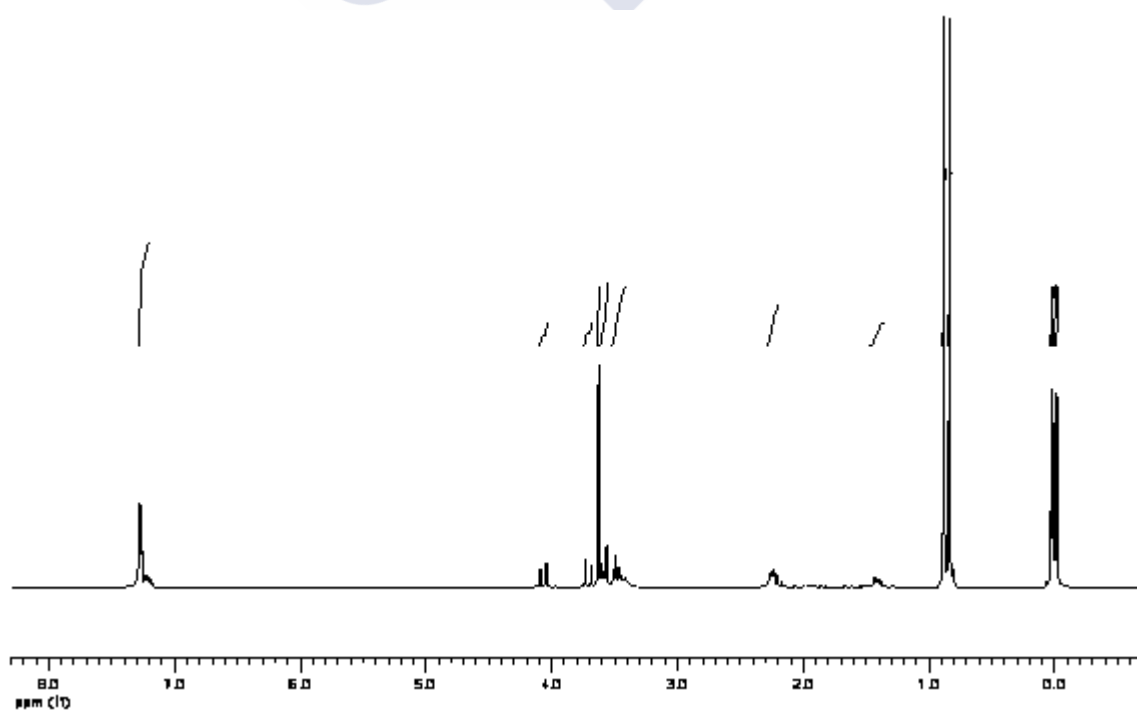
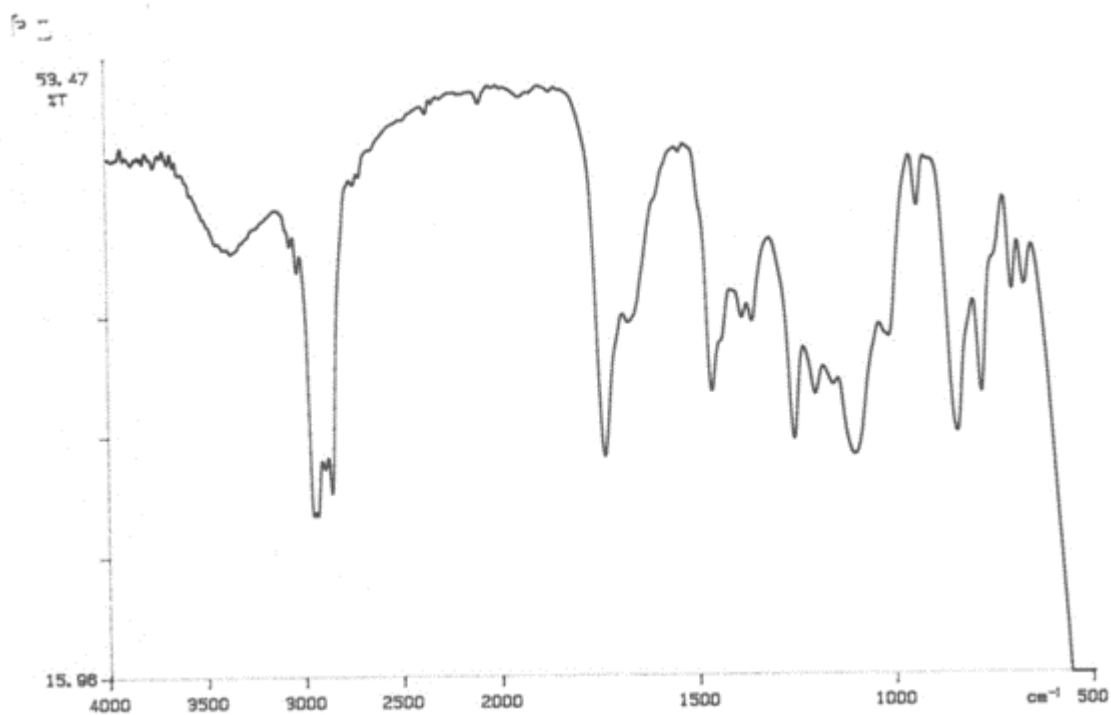
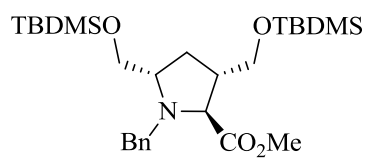
¹³C RMN (acetona-*d*₆) δ (ppm): 172,30 (C), 146,92 (C), 146,87 (C), 138,95 (C), 131,31 (C), 131,24 (C), 128,78 (CH), 128,72 (CH), 128,47 (CH), 128,41 (CH), 127,76 (CH), 127,72 (CH), 127,18 (CH), 125,38 (CH), 125,30 (CH), 121,94 (CH), 120,87 (CH), 120,81 (CH), 65,62 (CH₂), 61,13 (CH₂), 52,88 (CH), 52,21 (CH), 52,13 (CH), 50,69 (CH₂), 41,55 (CH₂), 30,36 (CH).

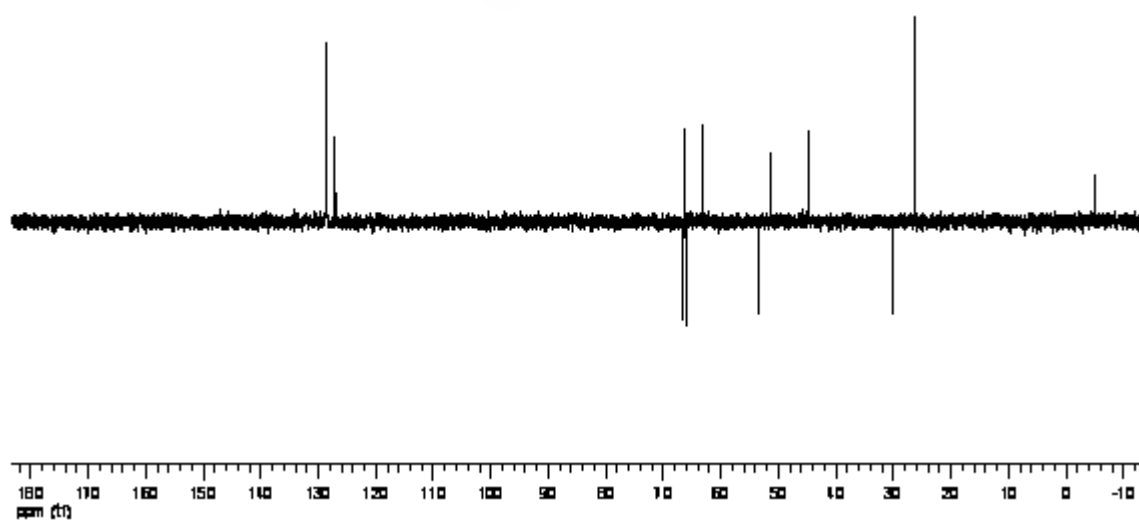
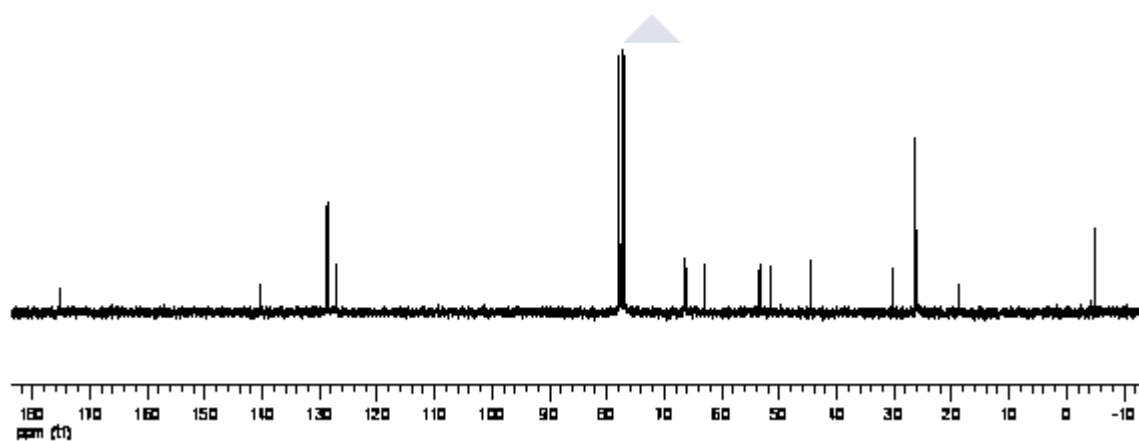
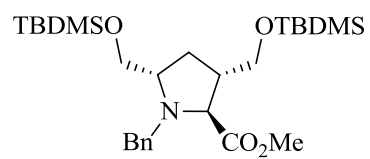
EM-IE *m/z* (%): 534 (3), 533 (M⁺, 7), 443 (20), 442 (69), 376 (11), 375 (44), 329 (15), 297 (13), 256 (13), 230 (9), 184 (8), 172 (15), 130 (11), 103 (10), 102 (8), 91 (100).

Microanálisis. Calculado para C₃₁H₃₁N₇O₂ (533,62): C 69,77, H 5,86, N 18,37. Encontrado: C 69,97, H 6,03, N 18,59.

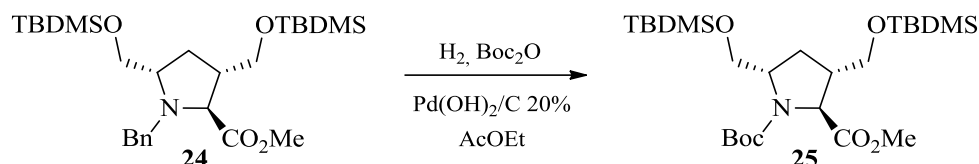








3.11. (±)-(2*R,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis[[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**25**)**



Sobre una suspensión de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20% (0,55 g, 3,89 mmol) y Boc_2O (2,21 g, 10,11 mmol) en AcOEt seco (40 mL), se añadió una disolución de **24** (3,95 g, 7,78 mmol) en AcOEt seco (100 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo 1 atmósfera de hidrógeno durante 18 h, transcurridas las cuales el catalizador se eliminó por filtración sobre celita y se lavó con AcOEt . El líquido filtrado se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl (5×25 mL), el extracto orgánico se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se eliminó a vacío, obteniéndose un residuo aceitoso (4,20 g) que se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna, empleando como soporte de gel de sílice y como eluyente hexano/ AcOEt (10:1). De las fracciones que contenían producto se aisló el compuesto **25** (3,10 g, 77%) como un aceite incoloro.

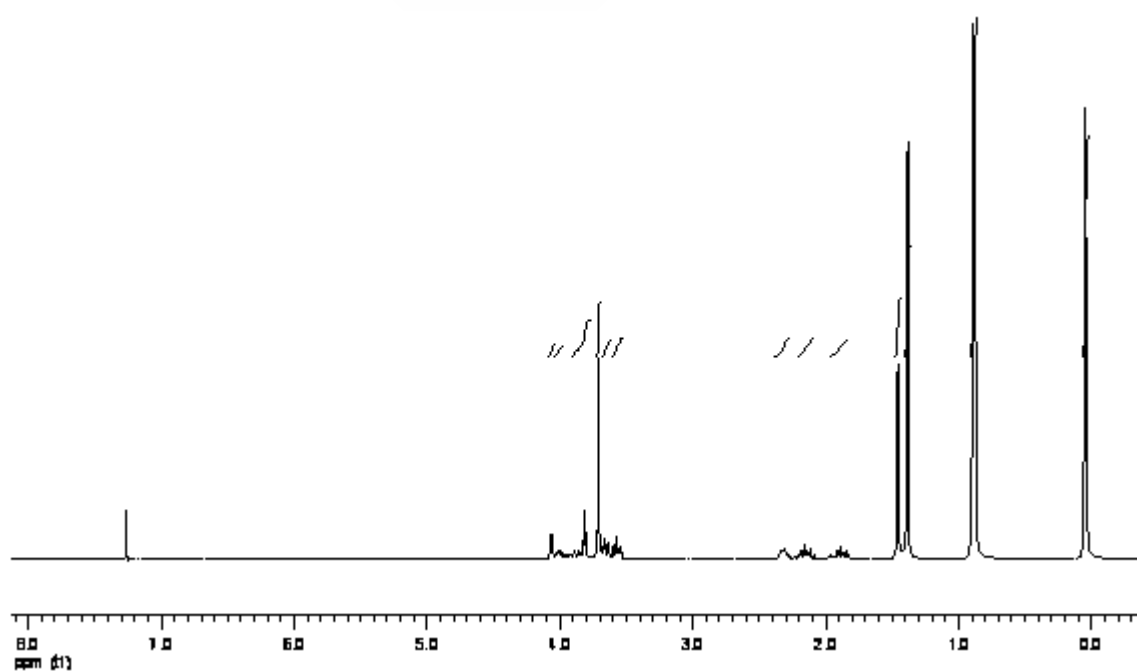
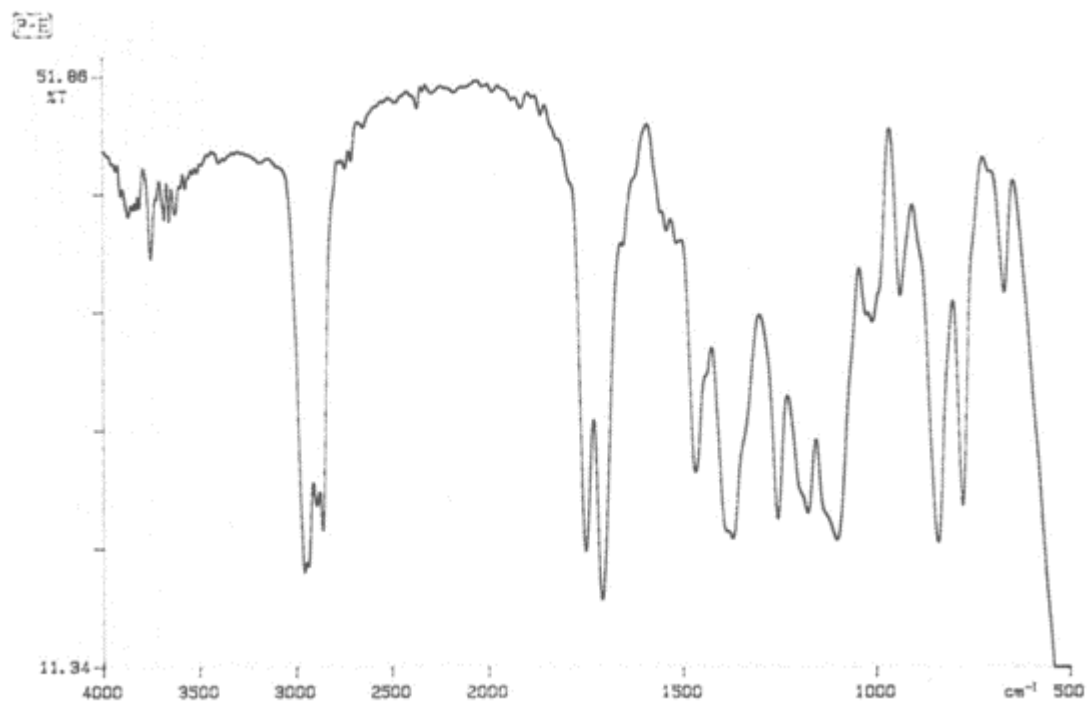
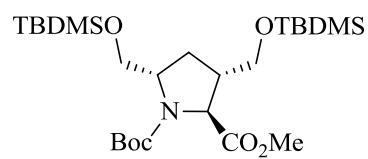
IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 3356, 2953, 2860, 1750, 1707, 1467, 1370, 1254, 1177, 1100, 840.

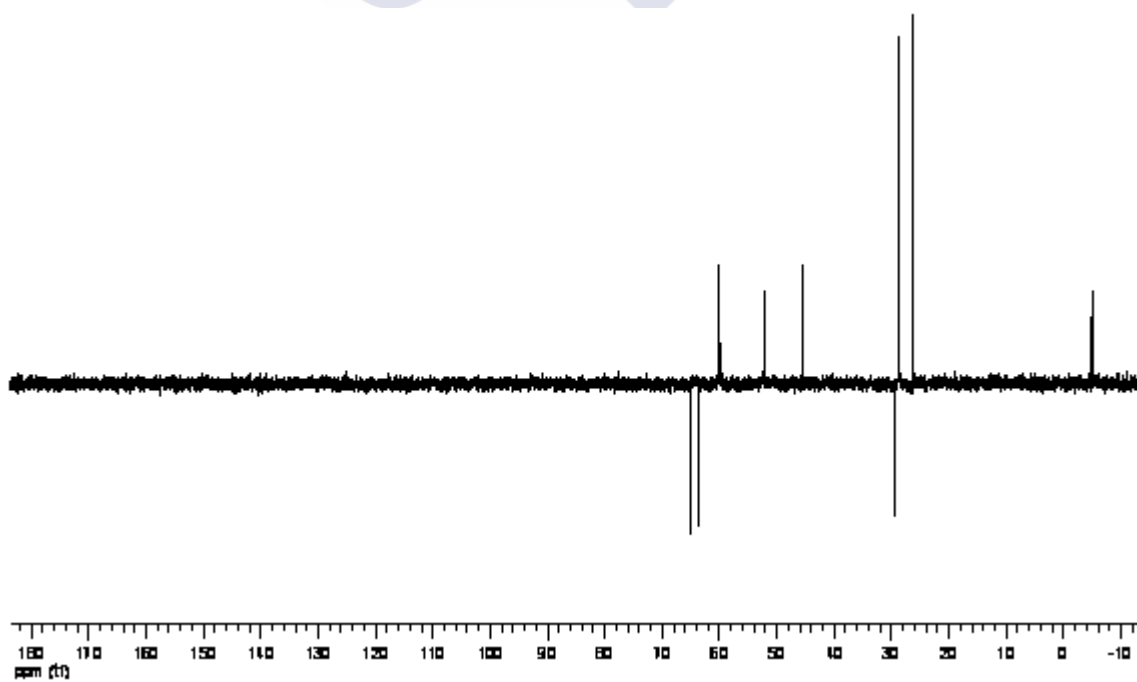
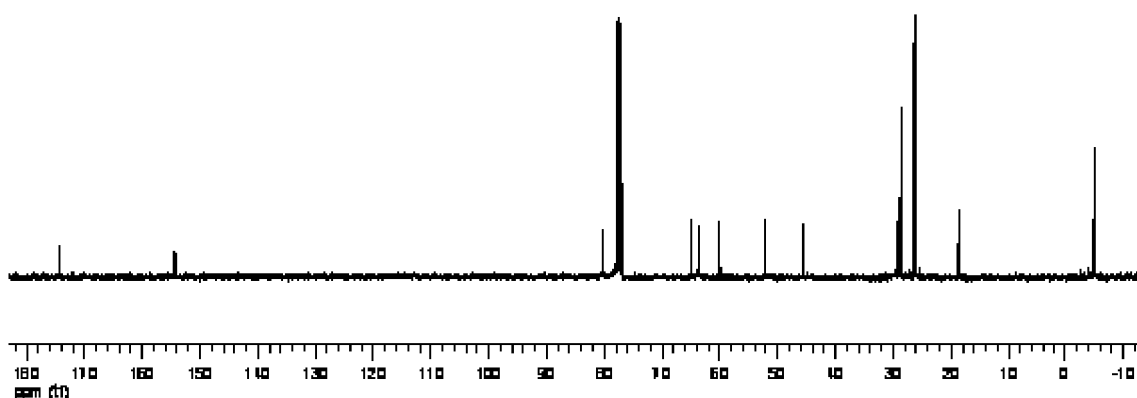
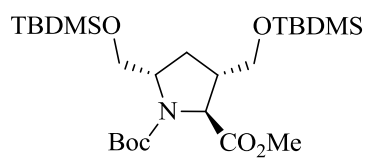
^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 4,06 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 4,02-4,0 (m, 1H), 3,82-3,80 (m, 2H), 3,71 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,67-3,63 (m, 1H), 3,59-3,54 (m, 1H), 2,33-2,29 (m, 1H), 2,19-2,11 (m, 1H), 1,93-1,83 (m, 1H, 4-*HH*), 1,46 (s, 3H, CH_3), 1,38 (s, 6H, 2 CH_3), 0,89 [s, 6H, 2 CH_3], 0,88 [s, 6H, 2 CH_3], 0,87 [s, 6H, 2 CH_3], 0,05 [s, 6H, 2 CH_3], 0,04 [s, 6H, 2 CH_3].

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 174,14 (C), 154,33 (C), 80,27 (C), 64,97 (CH_2), 63,52 (CH_2), 60,0 (CH), 52,22 (CH_3), 45,62 (CH), 29,37 (CH_2), 28,83 (CH), 28,63 (3 CH_3), 26,31 (3 CH_3), 26,23 (3 CH_3), 18,65 (C), 18,62 (C), -4,87 (CH_3), -4,91 (CH_3), -4,97 (2 CH_3).

EM-IE m/z (%): 444 [$(\text{M}^+ - \text{O}-t\text{-Bu})$, 2], 405 (11), 404 (37), 360 (31), 300 (25), 273 (20), 272 (100), 168 (16), 140 (23), 73 (60).

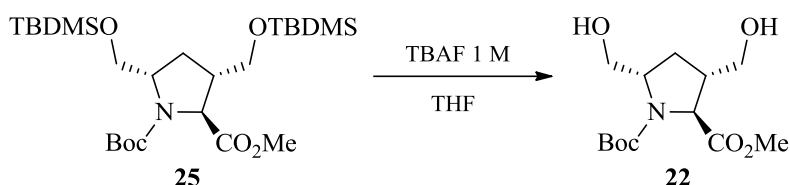
EM-AR m/z : calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{NO}_6\text{Si}_2$, 517,8465; encontrado, 517,8482.





3.12. (±)-(2*R**,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**22**)

3.12.1. Método A



Sobre una disolución de **25** (2,85 g, 5,50 mmol) en THF seco (30 mL) enfriada mediante un baño de hielo y bajo atmósfera de argón, se añadió una disolución de TBAF 1 M en THF (12,11 mL, 12,11 mmol). Tras retirar el baño de hielo, la mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 1 h, el disolvente se eliminó a sequedad y el residuo aceitoso (5,2 g) se fraccionó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando como eluyente CH₂Cl₂/MeOH (30:1); de las primeras fracciones tras la eliminación del disolvente a sequedad se aisló **22** como un aceite denso, que cristaliza lentamente dando un sólido blanco (1,40 g, 88%), p.f. = 89–92 °C.

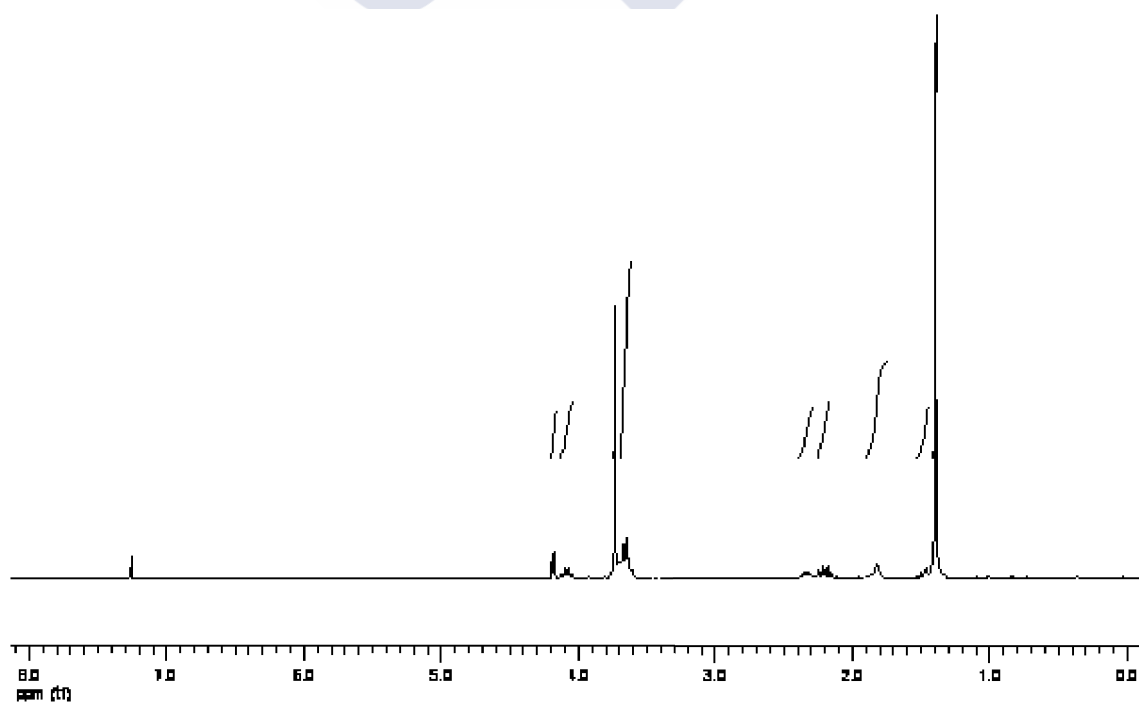
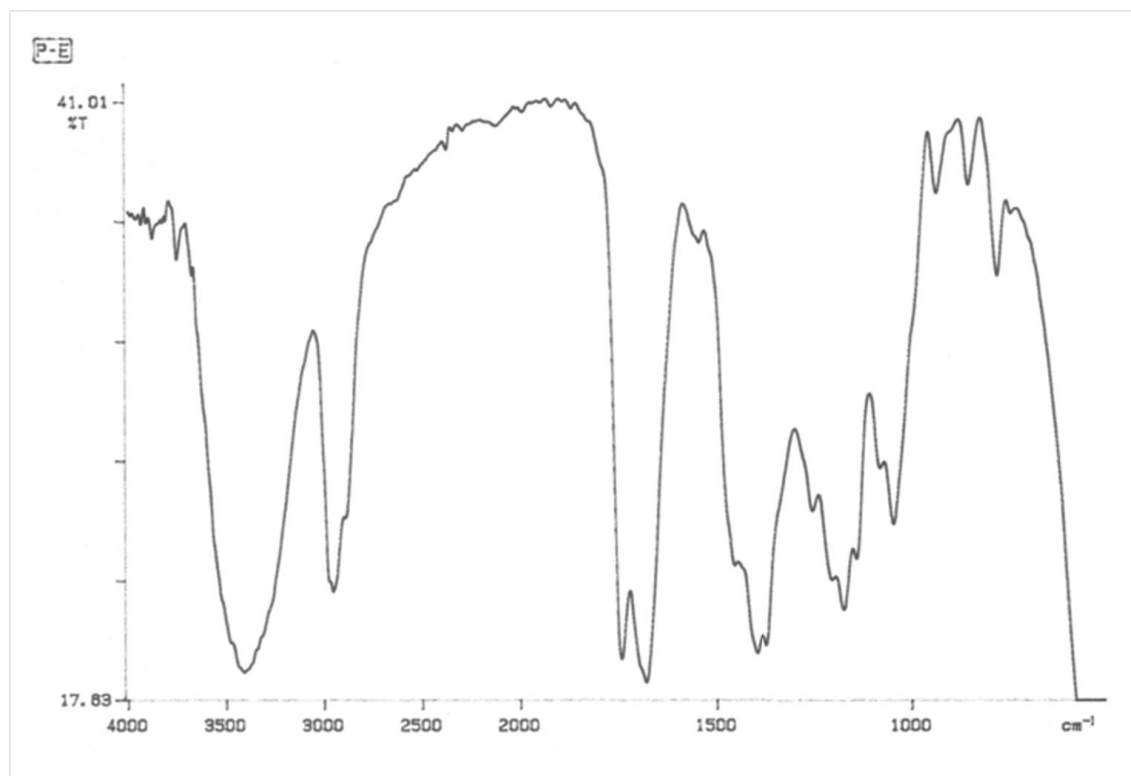
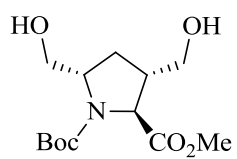
IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3407, 2952, 1742, 1680, 1396, 1173, 1046, 934, 780.

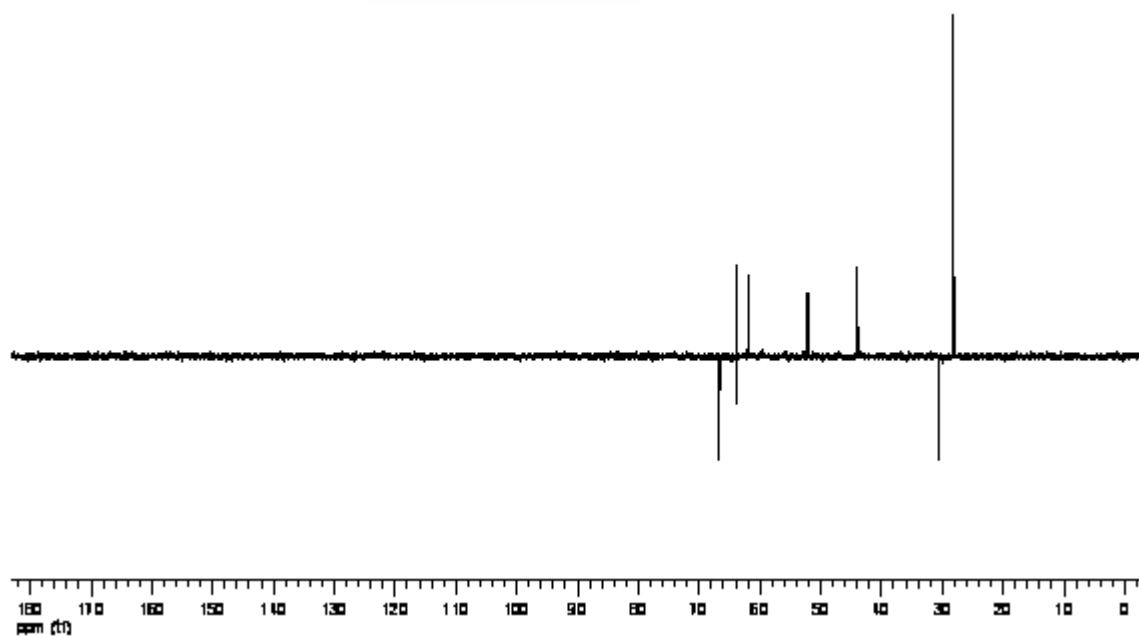
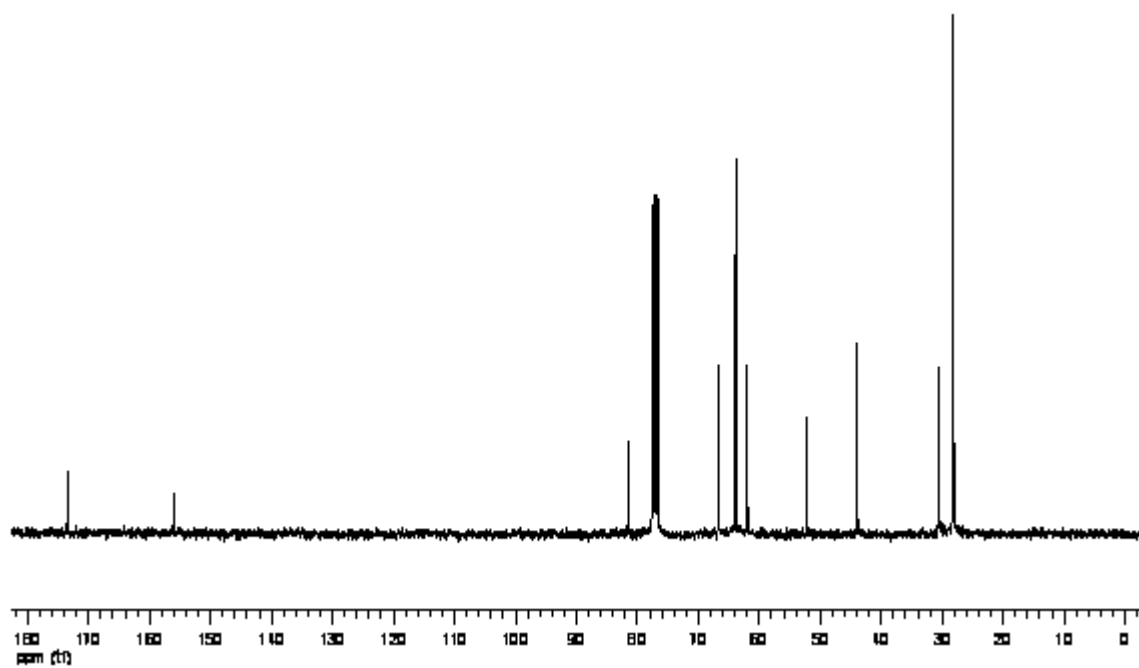
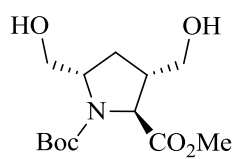
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,19 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H, 2-H), 4,13-4,04 (m, 1H, 5-H), 3,74 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,70-3,61 (m, 4H, 2 OCH₂), 2,40- 2,29 (m, 1H, 3-H), 2,25-2,15 (m, 1H, 4-*HH*), 1,82 (s an, 2H, intercambian con D₂O, 2 OH), 1,53-1,43 (m, 1H, 4-*HH*), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,84(C), 156,42 (C), 81,85 (C), 66,68 (CH₂), 63,92 (CH), 63,86 (CH₂), 61,97 (CH), 52,17 (CH₃), 43,96 (CH), 30,57 (CH₂), 28,15 (3 CH₃).

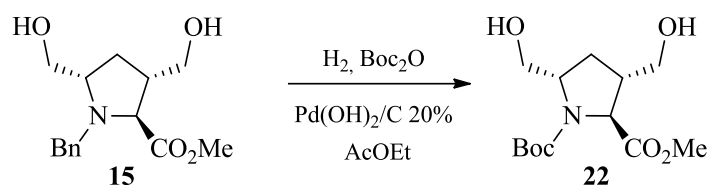
EM-IE *m/z* (%): 258 [(M⁺ – OCH₃), 7], 159 (8), 158 (100), 142 (8), 130 (17), 100 (9), 98 (11), 68 (17), 57 (42).

Microanálisis. Calculado para C₁₃H₂₃NO₆ (289,15): C 69,77, H 5,86, N 18,37. Encontrado: C 69,97, H 6,03, N 18,59.



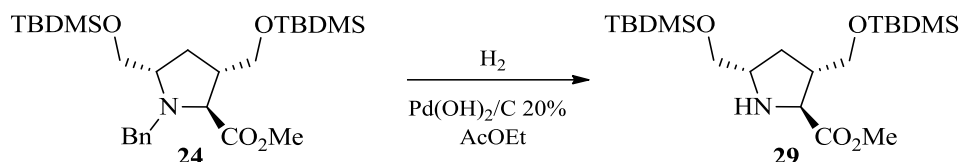


3.12.2. Método B



Una disolución de **15** (4,01 g, 14,36 mmol) en AcOEt seco (50 mL) fue añadida sobre una suspensión de Pd(OH)₂/C al 20% (1,01 g, 7,18 mmol) y Boc₂O (4,07 g, 18,67 mmol) en AcOEt seco (60 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo presión atmosférica de hidrógeno durante 72 h, transcurridas las cuales el catalizador se eliminó por filtración sobre celita y se lavó con AcOEt. La eliminación del disolvente del líquido filtrado a vacío, condujo a un residuo aceitoso (5,50 g) que se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna empleando como soporte gel de sílice y como eluyente hexano/AcOEt (1:3). De las fracciones que contenían producto, se aisló el compuesto **22** (4,00 g, 96%) como un sólido blanco cuyas propiedades físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las del compuesto obtenido por el *Método A* (apartado 3.12.1).

3.13. (±)-(2*R,3*R**,5*R**)-3,5-Bis[[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**29**)**



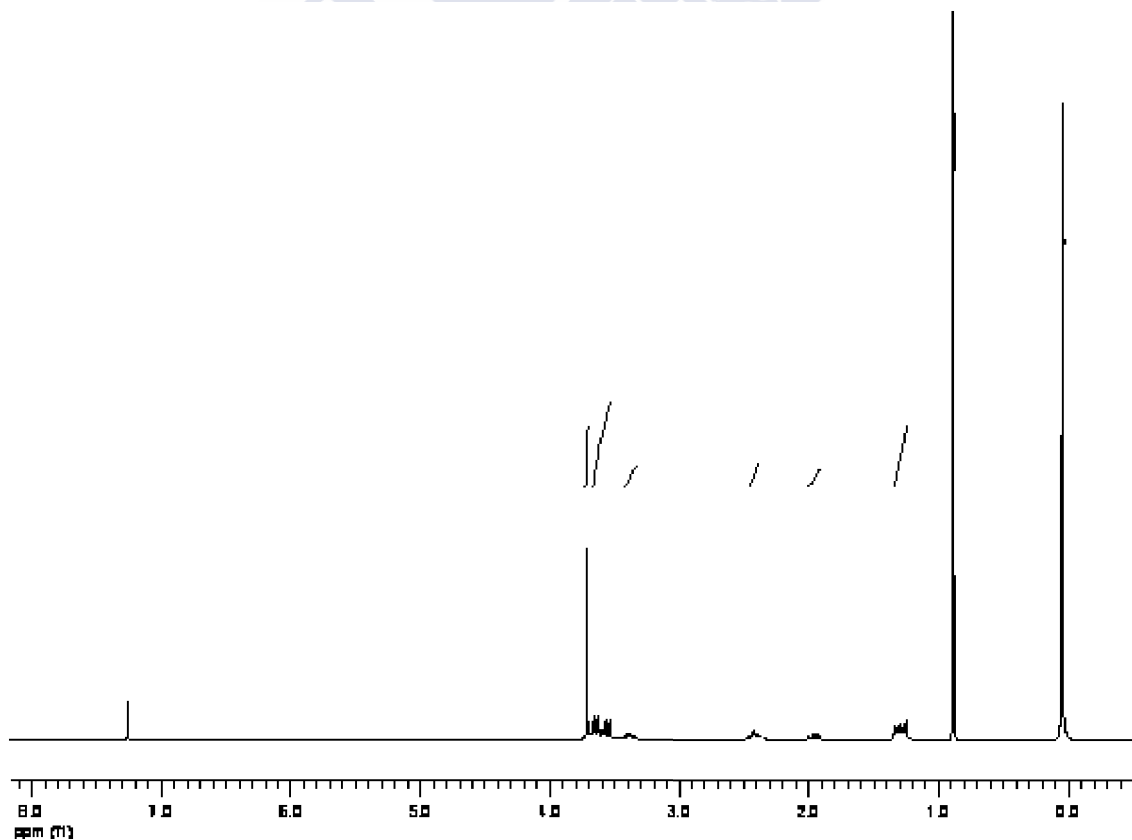
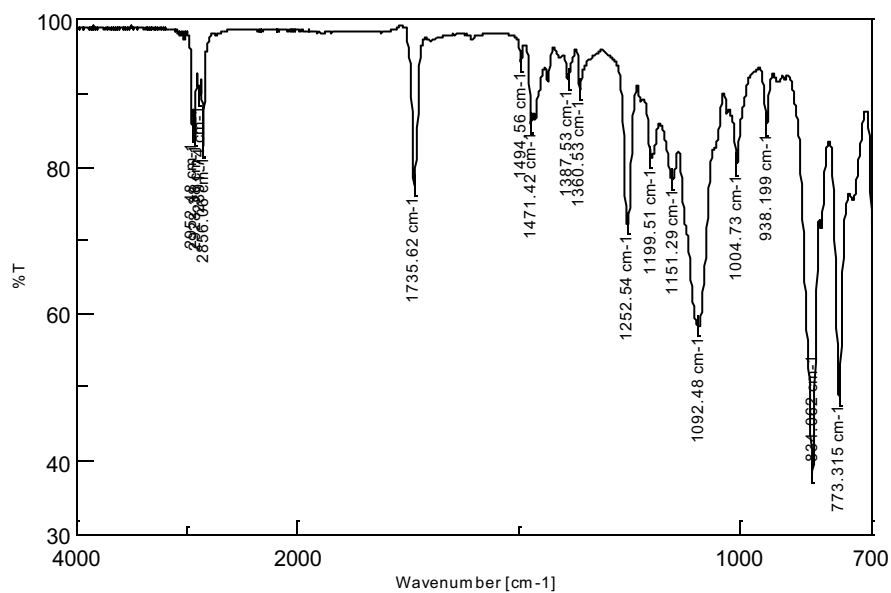
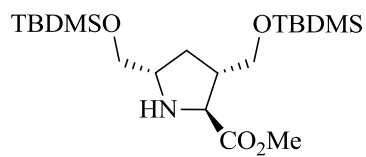
Sobre una suspensión de Pd(OH)₂/C 20% (21 mg, 0,15 mmol) en AcOEt seco (3 mL), se añadió una disolución de **24** (150 mg, 0,296 mmol) en AcOEt seco (3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo presión de hidrógeno durante 7 días. El catalizador se eliminó por filtración sobre celita, se lavó con AcOEt, y el disolvente se eliminó a vacío, obteniéndose un residuo aceitoso (125 mg) que se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna empleando como soporte gel de sílice y como eluyente hexano/AcOEt (10:1). De las fracciones que contenían producto se aisló **29** (52 mg, 42%) como un aceite amarillo.

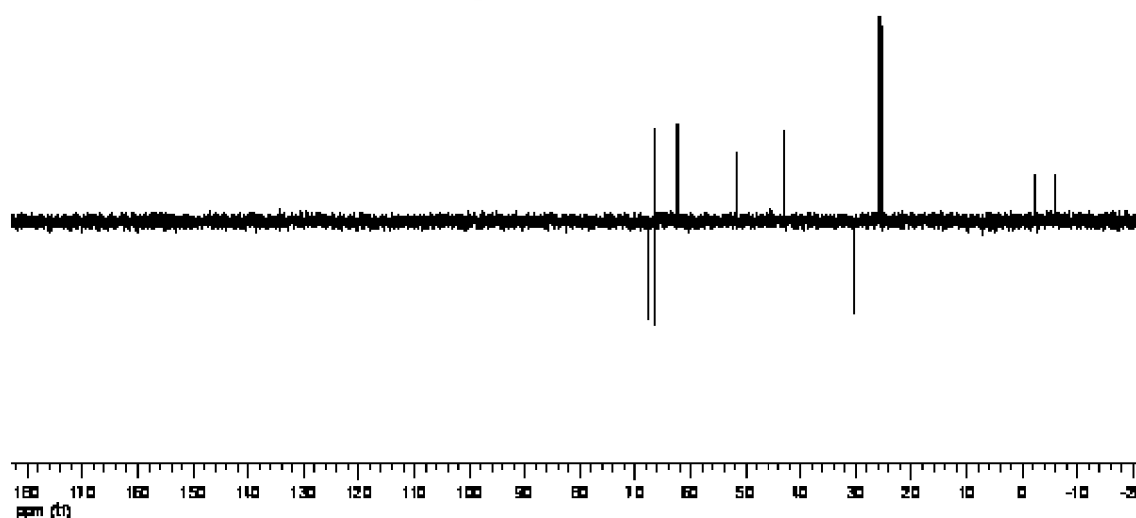
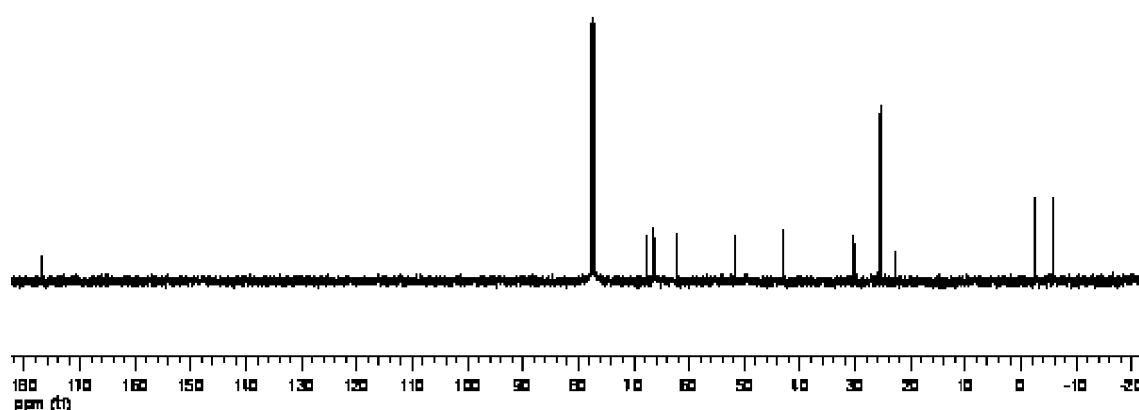
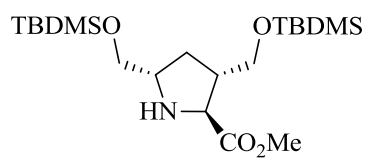
IR ν (cm⁻¹): 2928, 2856, 1736, 1471, 1387, 1252, 1200, 1092, 773.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 3,72 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,69-3,50 (m, 4H), 3,42-3,39 (m, 1H), 2,47-2,39 (m, 1H), 2,04-1,91 (m, 1H), 1,37-1,25 (m, 3H, uno de ellos intercambia con D₂O, 4-H₂ y NH), 0,89 (s, 18H, 6 CH₃), 0,05 (s, 12H, 4 CH₃).

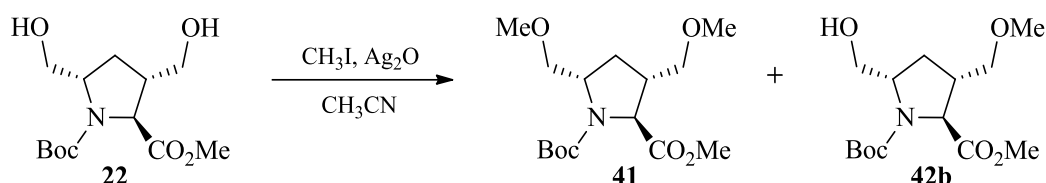
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 176,89 (C), 67,57 (CH₂), 66,40 (CH), 66,51 (CH₂), 62,08 (CH), 51,65 (CH₃), 43,09 (CH), 30,21 (CH₂), 25,76 [(CH₃)₃], 25,42 [(CH₃)₃], 22,79 (C), 22,73 (C), -2,37 (2 CH₃), -5,9 (2 CH₃).

EM-AR *m/z*: calculado para C₂₀H₄₃NO₄Si₂, 417,2737; encontrado, 417,2744.





3.14. (\pm)-(2*R,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis(metiloximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (41) y (\pm)-(2*R**,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-(metiloximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (42b)**



Sobre una disolución de **22** (100 mg, 0,34 mmol) y CH₃I (1 mL, 7,0 mmol) en CH₃CN (6 mL), se añadió Ag₂O (240 mg, 1,04 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C, bajo atmósfera de argón durante 60 h, tras las cuales una vez alcanzada la temperatura ambiente, se filtró el sólido en suspensión y se lavó con CH₃CN. La eliminación del disolvente del líquido filtrado a sequedad, condujo a un aceite amarillo (100 mg) que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente hexano/AcOEt (1:0,25). De un primer grupo de fracciones que contenían producto se aisló el compuesto **41** (50 mg, 46%) y de un segundo grupo de fracciones el compuesto **42b** (40 mg, 38%).

Compuesto **41**: aceite amarillo.

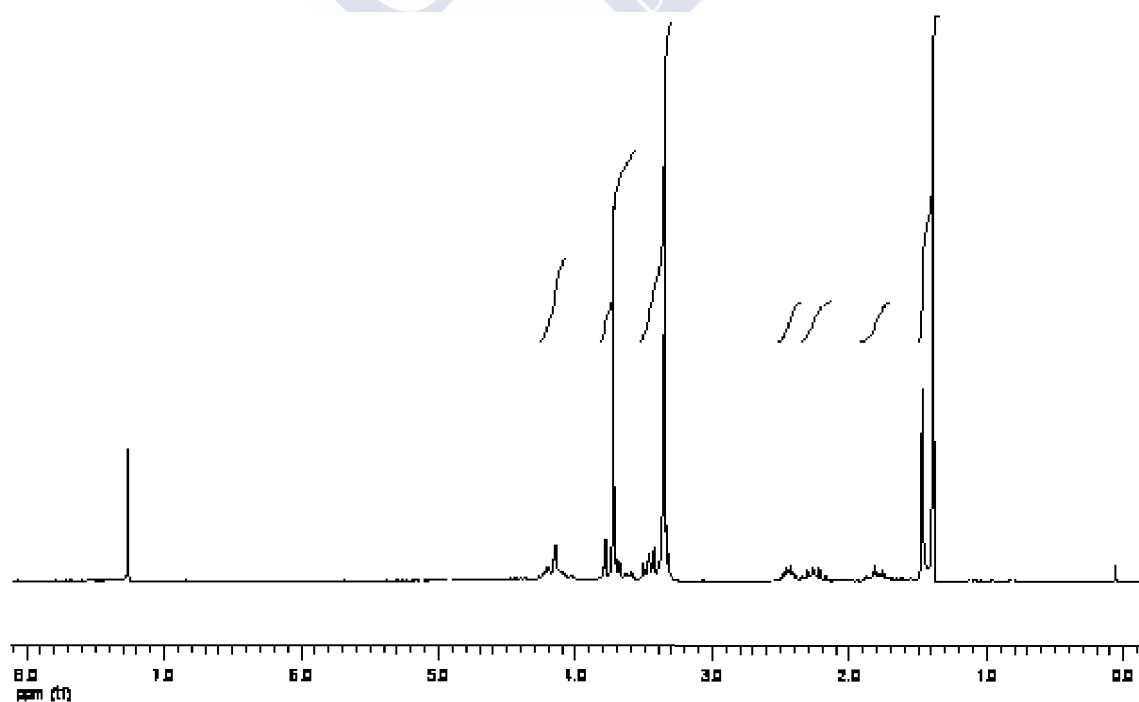
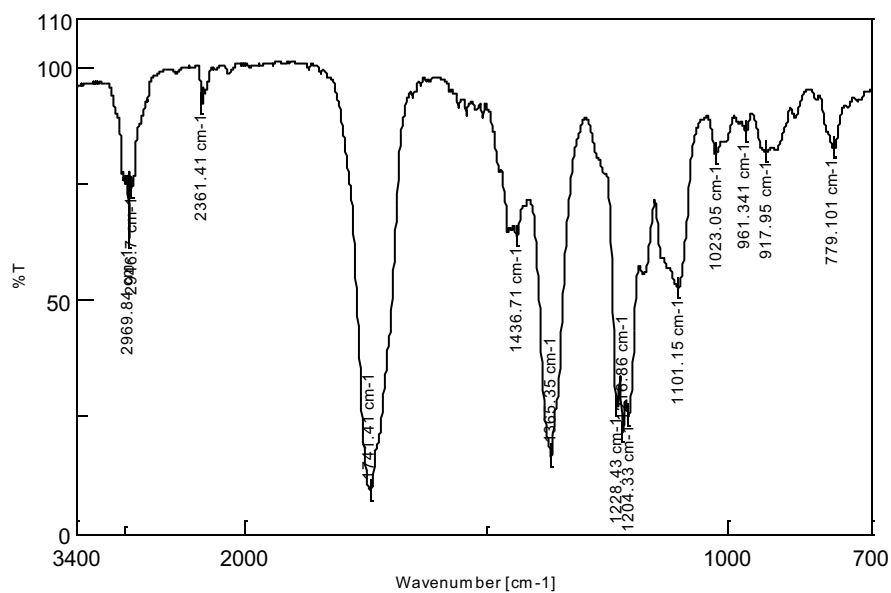
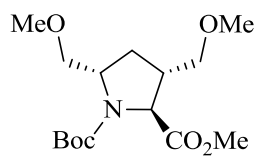
IR ν (cm⁻¹): 2970, 1741, 1437, 1365, 1228, 1216, 1204, 1101.

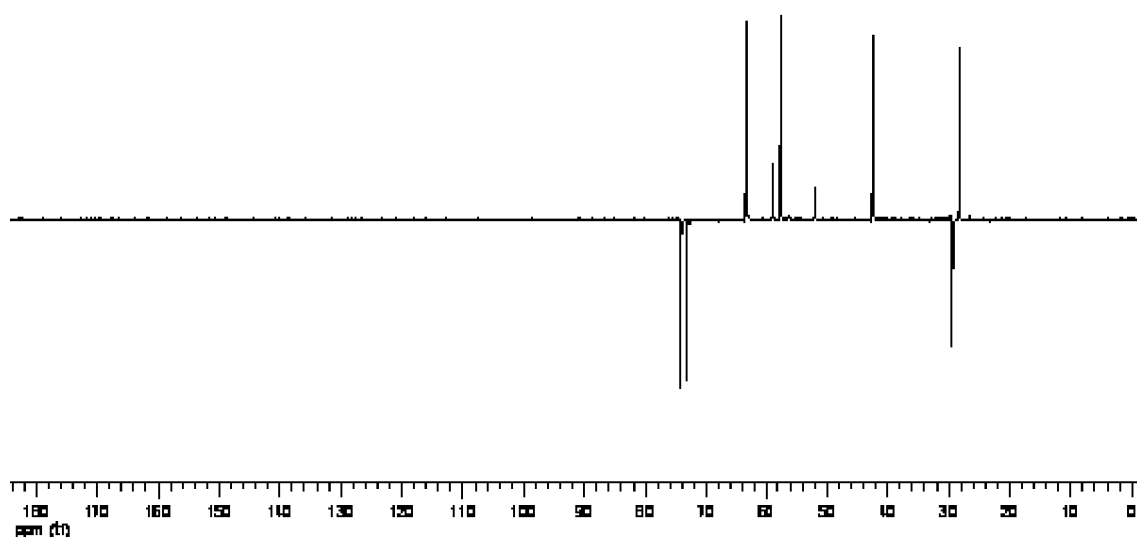
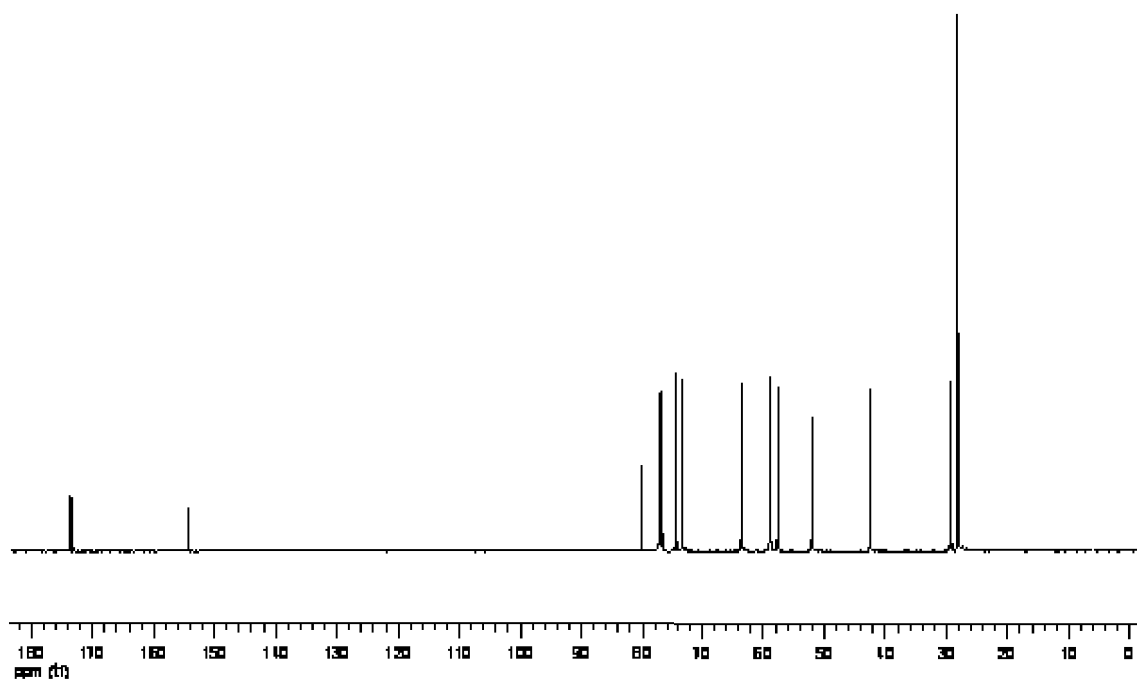
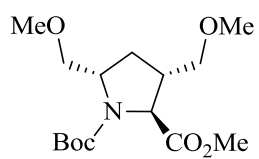
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,26-4,07 (m, 2H), 3,80-3,67 (m, 2H), 3,73 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,51-3,32 (m, 2H), 3,37 (s, 3H, OCH₃), 3,33 (s, 3H, OCH₃), 2,48-2,40 (m, 1H, 5-H), 2,26 (dd, J = 13,3, 8,9 Hz, 1H, 4-HH), 1,80 (dt, J = 13,3, 4,1 Hz, 1H, 4-HH), 1,47 (s, 3H, CH₃), 1,39 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,53 (C), 154,30 (C), 80,20 (C), 74,24 (CH₂), 73,26 (CH₂), 63,55 (CH), 58,91 (CH₃), 58,74 (CH₃), 57,64 (CH), 51,96 (CH₃), 42,49 (CH), 29,24 (CH₂), 28,18 (3 CH₃).

EM-IE m/z (%): 317 (M⁺, 2), 273 (9), 272 (54), 216 [(M⁺ - *t*-Bu), 35], 202 (15), 173 (30), 172 [(M + 1)⁺ - (O-*t*-Bu + CH₂O₂CH₃), 100], 158 (39), 139 (23), 126 (14), 112 (19), 97 (9), 80 (29), 71 (12), 57 (92).

EM-AR m/z : calculado para C₁₅H₂₇NO₆, 317,1838; encontrado, 317,1845.





Compuesto **42b**: aceite incoloro.

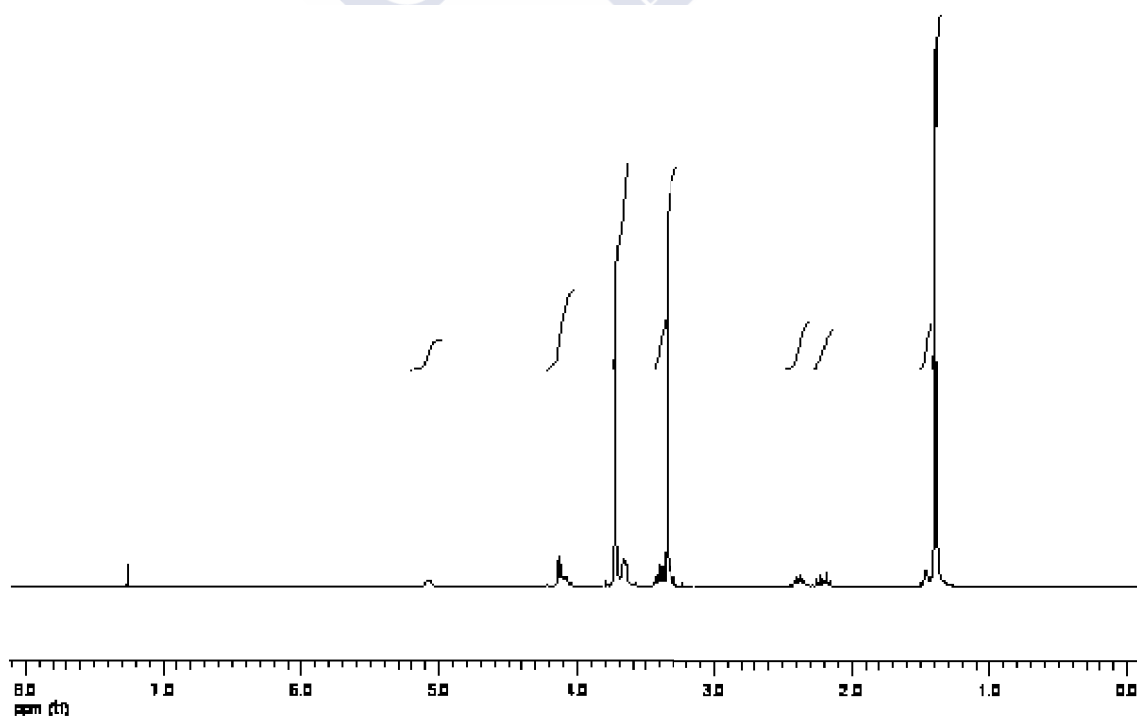
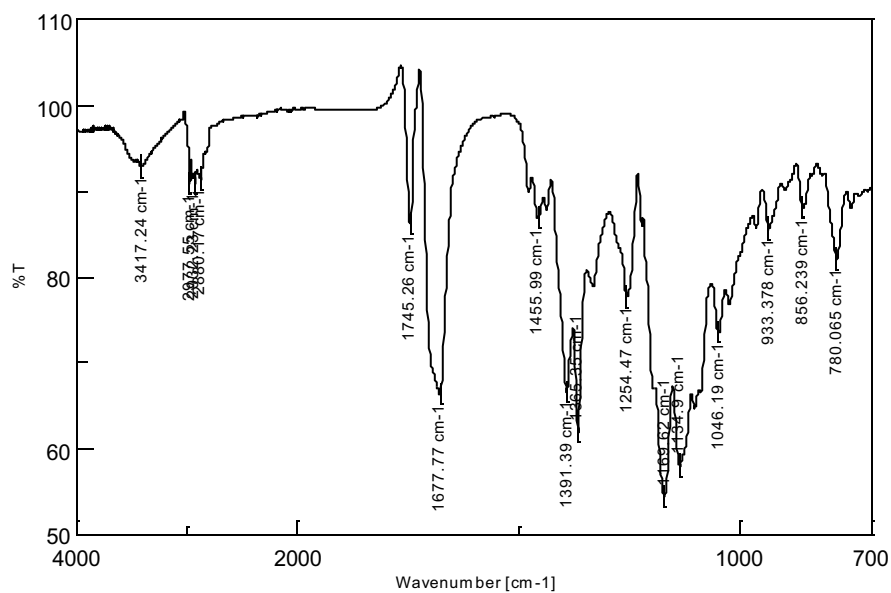
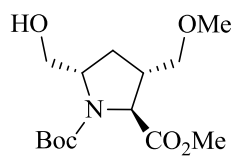
IR v (cm⁻¹): 3417, 2977, 2932, 2880, 1745, 1678, 1391, 1365, 1169, 1135.

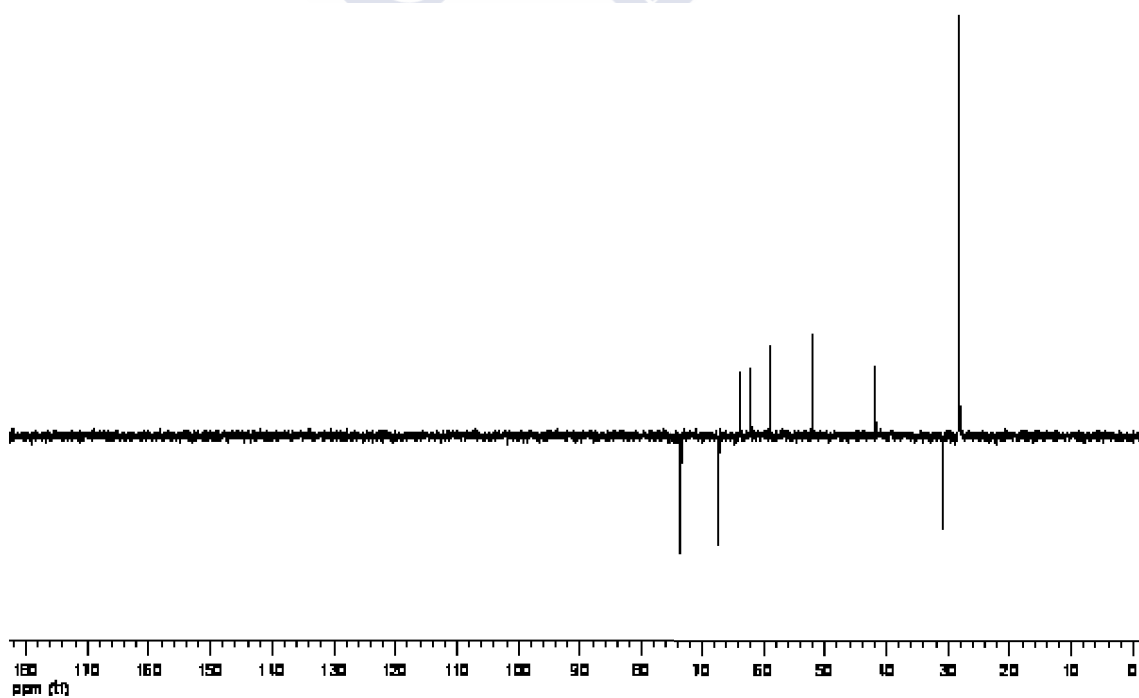
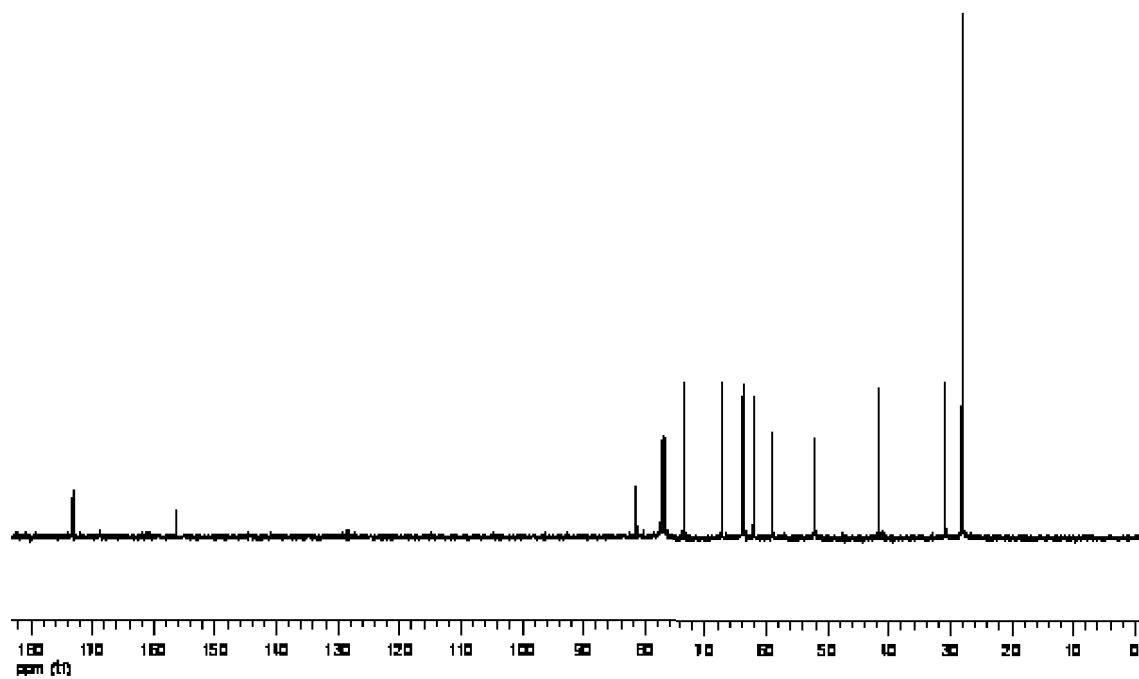
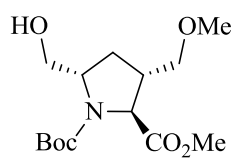
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 5,08 (s an, 1H, intercambia con D₂O, OH), 4,14-4,08 (m, 2H), 3,73 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,72-3,64 (m, 2H), 3,44-3,38 (m, 1H), 3,35 (s, 3H, OCH₃), 3,33-3,30 (1H), 2,40-2,34 (m, 1H, 5-H), 2,20 (dt, *J* = 12,9, 7,7 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,50-1,43 (m, 1H, 4-*HH*), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,18 (C), 156,23 (C), 81,43 (C), 73,37 (CH₂), 67,19 (CH₂), 63,77 (CH), 62,08 (CH₃), 58,94 (CH), 52,08 (CH₃), 41,81 (CH), 30,89 (CH₂), 28,14 (3 CH₃).

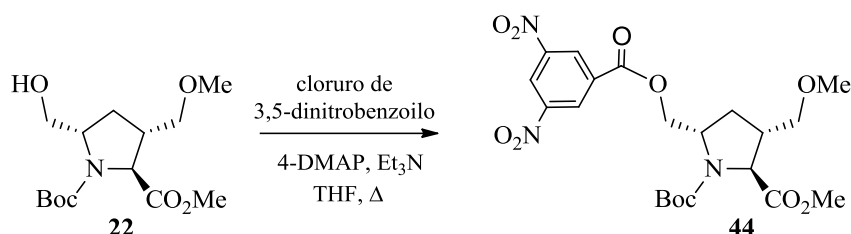
EM-IE *m/z* (%): 172 [(M + 1)⁺ - (Boc + OCH₃), 63], 158 (13), 144 (14), 80 (20), 59 (7), 58 (7), 57 (100).

EM-AR *m/z*: calculado para C₁₄H₂₅NO₆, 303,1682; encontrado, 303,1695.





3.15. (±)-(2*R,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-5-[[3,5-dinitrobenzoil]oxi]metil]-3-(metoximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (44)**



Sobre una disolución de **42b** (160 mg, 0,53 mmol) en THF seco (9 mL), se añadió cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo (182 mg, 0,79 mmol), 4-DMAP (4,0 mg) y Et₃N (0,08 mL). La mezcla de reacción se agitó a 70 °C bajo atmósfera de argón durante 45 h, tras las cuales el THF se eliminó bajo presión reducida y el residuo resultante se repartió entre una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 mL) y AcOEt (30 mL). La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 × 30 mL), las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 × 30 mL) y se secaron sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a vacío proporcionó un residuo aceitoso (180 mg) que se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt (6:1), la eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto condujo a **44** (120 mg, 46%) como un aceite incoloro.

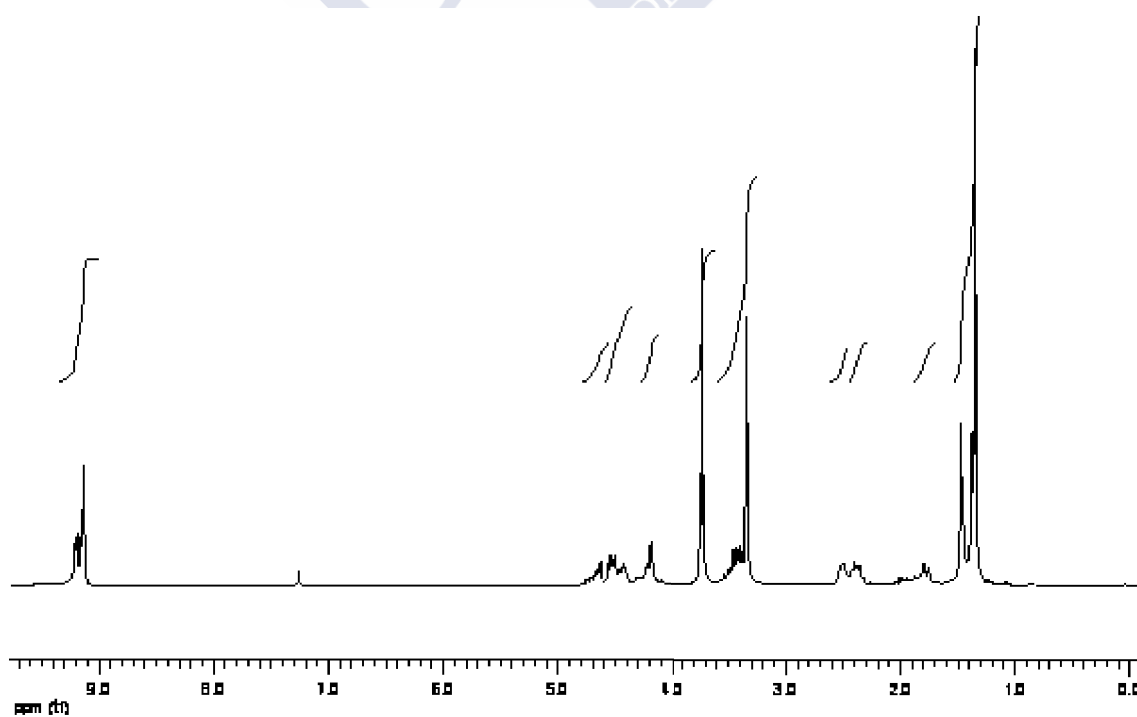
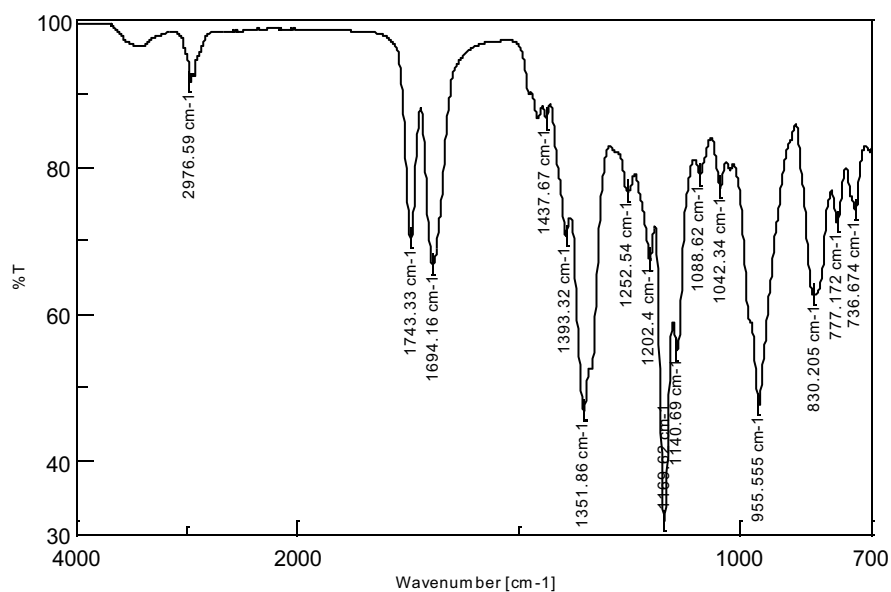
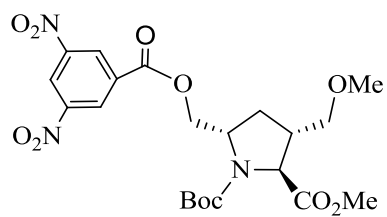
IR ν (cm⁻¹): 2977, 1743, 1694, 1438, 1393, 1352, 1168, 1141, 955, 830.

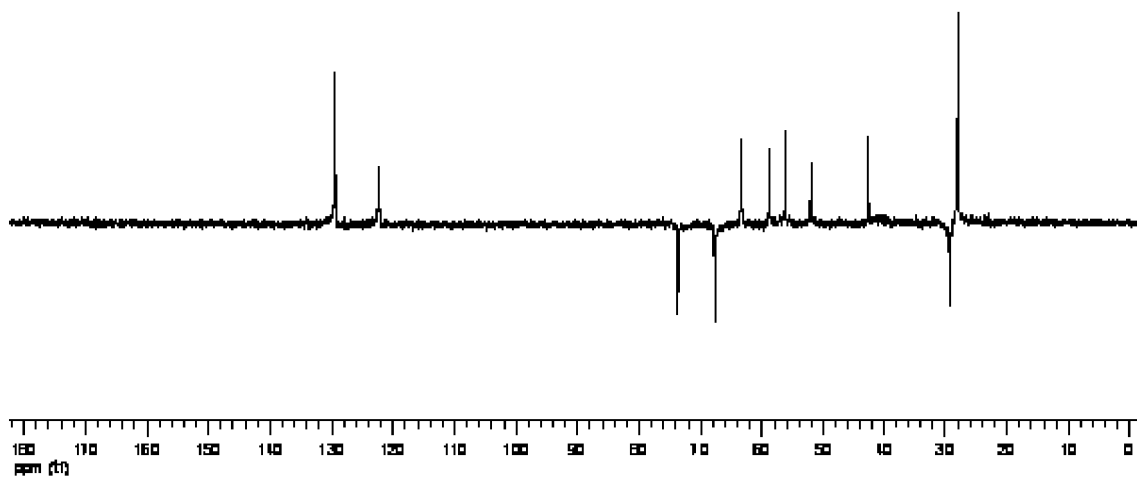
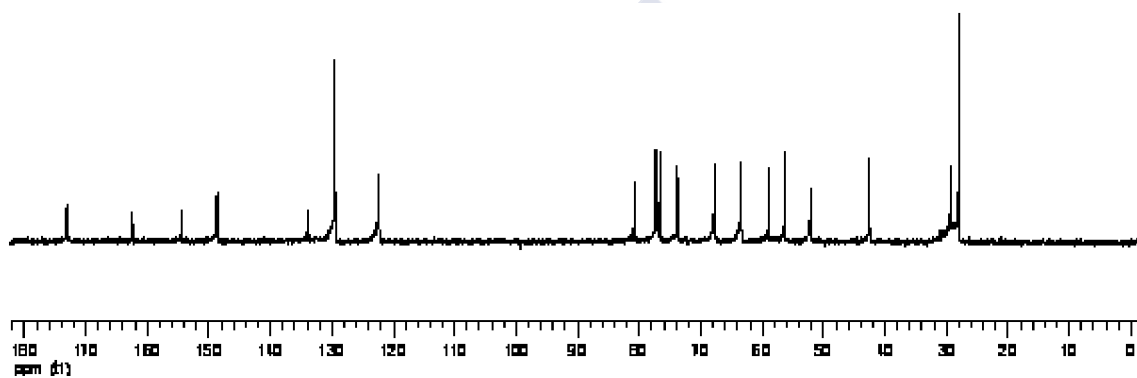
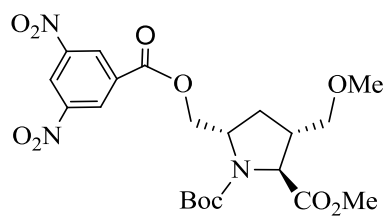
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 9,21-9,13 (m, 3H), 4,71-4,63 (m, 1H), 4,56-4,43 (m, 2H), 4,24-4,18 (m, 1H), 3,73 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,54-3,38 (m, 2H), 3,34 (s, 3H, OCH₃), 2,51-2,44 (m, 1H, 5-H), 2,42-2,32 (m, 1H, 4-HH), 1,83-1,74 (m, 1H, 4-HH), 1,47 (s, 3H, CH₃), 1,34 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,18 (C), 162,39 (C), 154,41 (C), 148,69 (C), 148,61 (C), 133,94 (C), 129,53 (CH), 122,52 (CH), 122,32 (CH), 80,88 (C), 73,76 (CH₂), 67,79 (CH₂), 63,51 (CH), 58,89 (CH), 56,37 (CH), 52,16 (CH₃), 42,51 (CH), 29,36 (CH₂), 28,07 (3 CH₃).

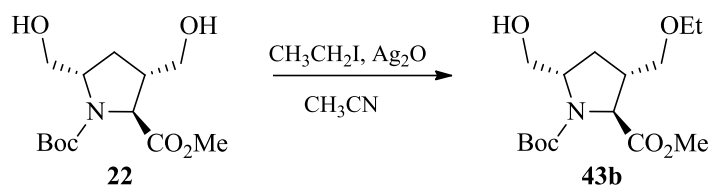
EM-IE *m/z* (%): 336 [(M + 1)⁺ - (Boc + CO₂CH₃), 8], 237 (11), 236 (87), 208 (18), 140 (15), 126 (13), 112 (22), 94 (21), 82 (13), 80 (29), 68 (14), 57 (100).

EM-AR *m/z*: calculado para C₂₁H₂₇N₃O₁₁, 497,1646; encontrado, 497,1661.





3.16. (±)-(2*R,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3-(etiloximetil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (43b)**



Se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.14, haciendo reaccionar **22** (200 mg, 0,68 mmol) con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{I}$ (4 mL, 7,0 mmol) durante 115 h. El residuo aceitoso obtenido tras la elaboración de la masa de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente hexano/AcOEt (1:1), aislándose por eliminación del disolvente del primer grupo de fracciones que contenían producto, el compuesto **22** inalterado (90 mg) y de un segundo grupo **43b** (90 mg, 37%) como un aceite incoloro.

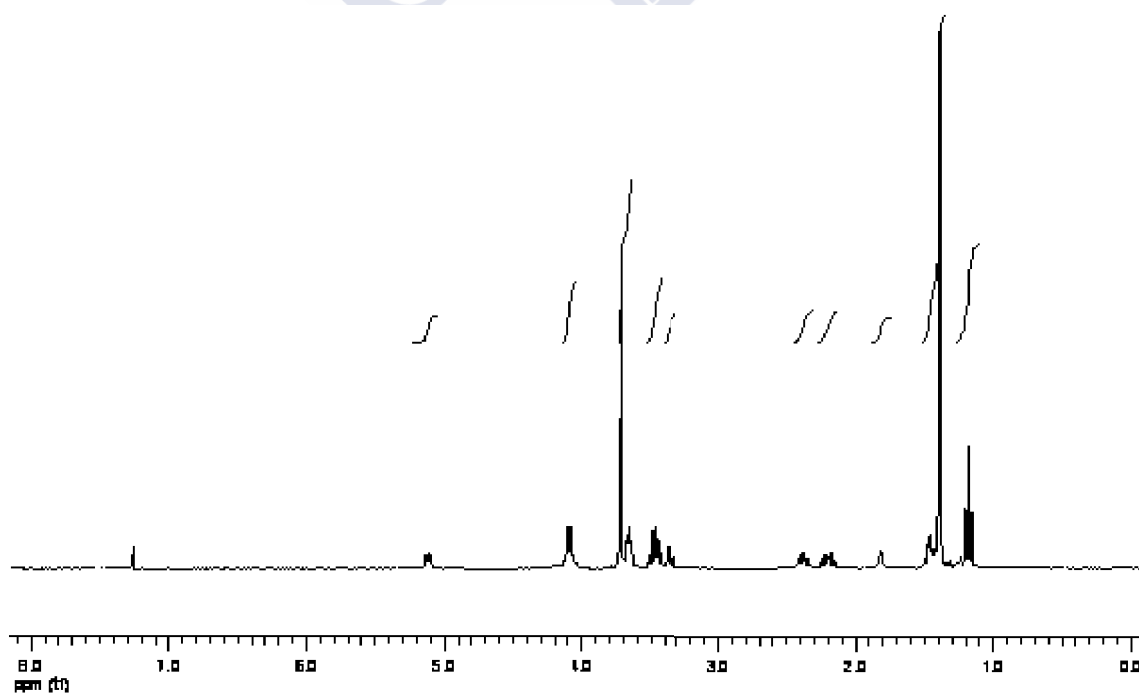
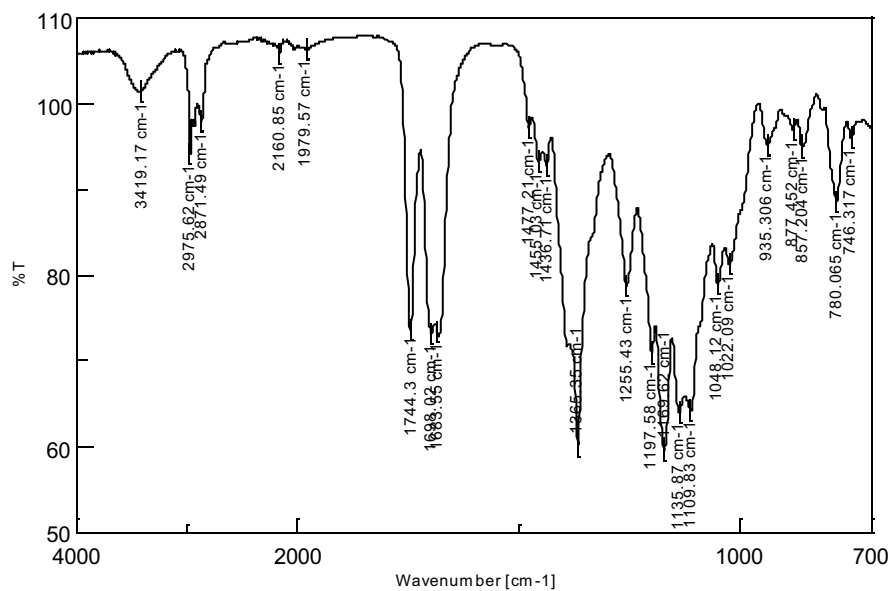
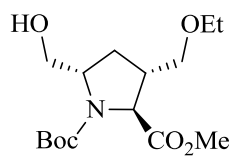
IR ν (cm^{-1}): 3419, 2976, 2871, 1744, 1698, 1680, 1392, 1365, 1255, 1169, 1136.

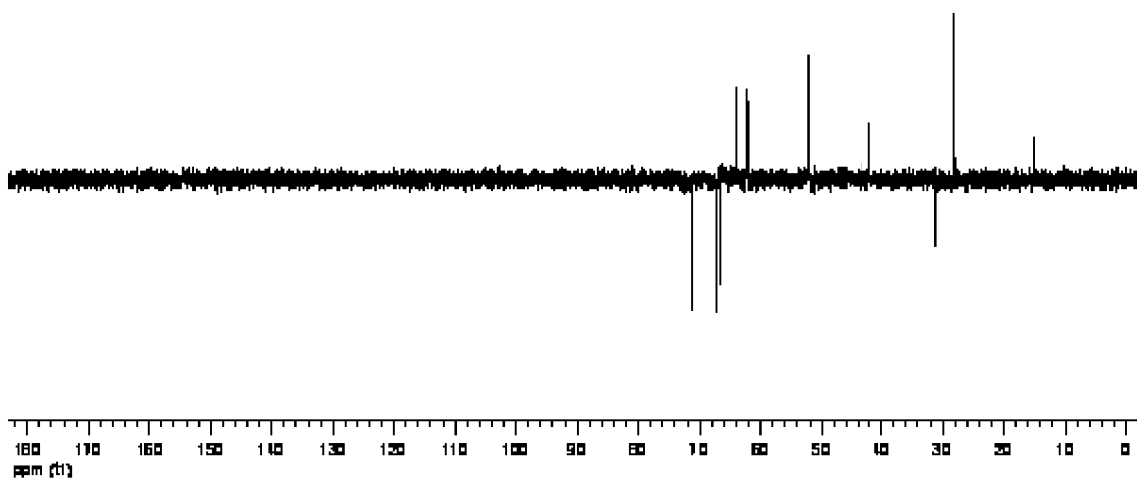
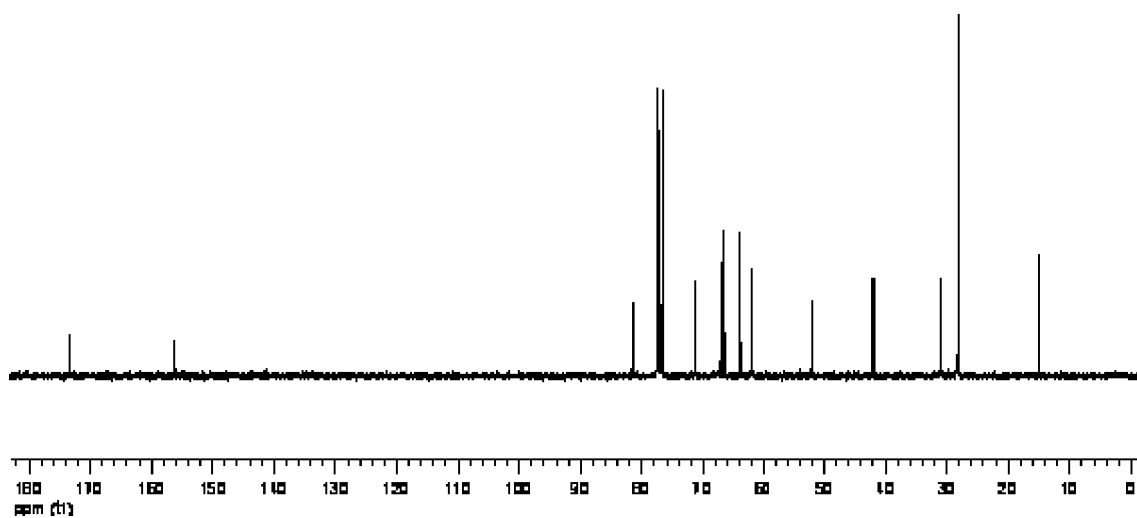
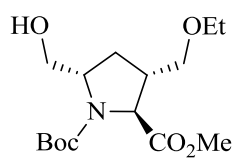
^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 5,13-5,09 (s an, 1H, intercambia con D_2O , OH), 4,12-4,07 (m, 2H), 3,71 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,67-3,64 (m, 2H), 3,51-3,42 (m, 2H, CH_2CH_3), 3,38-3,32 (m, 1H), 2,41-2,35 (m, 1H, 5-H), 2,24-2,17 (m, 1H, 4-HH), 1,86 (s an, 1H), 1,50-1,43 (m, 1H, 4-HH), 1,39 (s, 9H, 3 CH_3), 1,18 (dt, $J = 7,1, 1,2$ Hz, 3H, CH_2CH_3).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 173,21 (C), 156,17 (C), 81,39 (C), 71,21 (CH_2), 67,15 (CH_2), 66,54 (CH_2), 63,92 (CH), 62,17 (CH), 52,02 (CH_3), 41,99 (CH), 30,12 (CH_2), 28,14 (3 CH_3), 14,95 (CH_3).

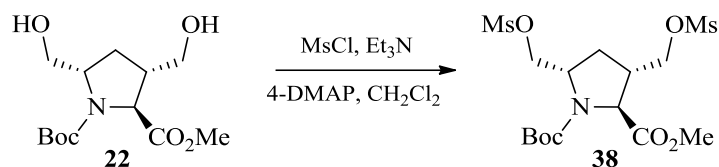
EM-IE m/z (%): 318 [$(\text{M} + 1)^+$, 10], 263 (14), 262 (100), 218 (54), 186 (18), 80 (14), 68 (18), 59 (23), 57 (65).

EM-AR m/z : calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_6$, 317,1838; encontrado, 317,1854.





3.17. (±)-(2*R,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis[[(metilsulfonil)oxi]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (38)**



El compuesto **38** se preparó siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **35** (véase apartado 3.7) pero utilizando el compuesto **22** (0,40 g, 1,38 mmol) como material de partida. La elaboración habitual del bruto de reacción condujo a un residuo aceitoso que tras ser sometido a purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice con hexano/AcOEt (1:3) como eluyente, rindió **38** (0,59 g, 96%) como un aceite amarillo claro.

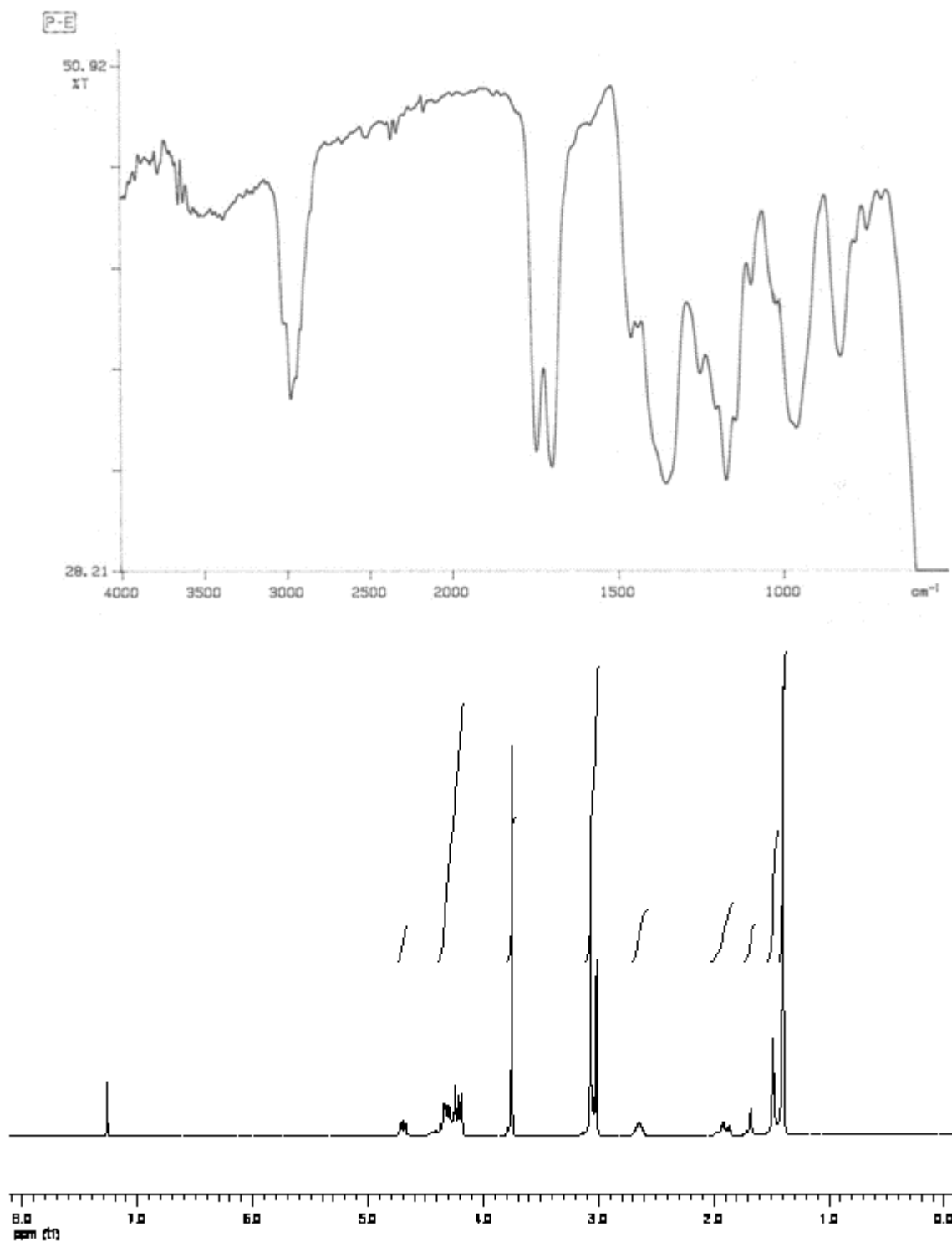
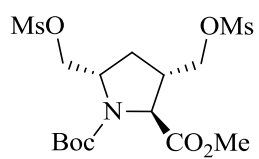
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2977, 1746, 1699, 1355, 1174, 961, 829, 747.

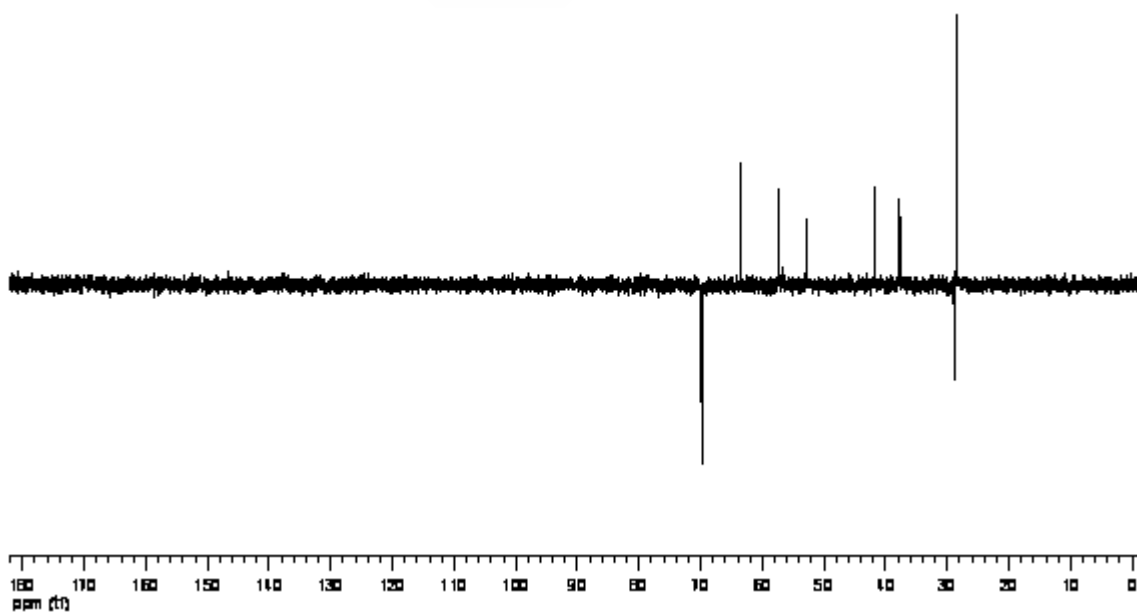
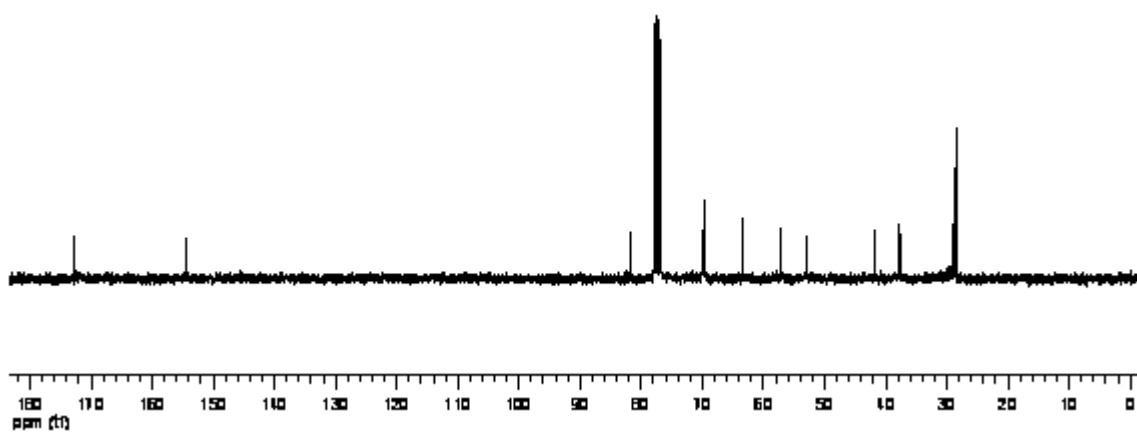
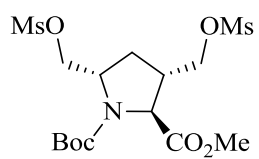
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,70 (dd, J = 10,1, 4,6 Hz, 1H, 2-H), 4,38-4,19 (m, 5H, 2 OCH₂ y 5-H), 3,75 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,07 (s, 3H, SO₂CH₃), 3,02 (s, 3H, SO₂CH₃), 2,43 (dt, J = 13,8, 8,9 Hz, 1H, 4-HH), 1,89 (dt, J = 13,8, 4,6 Hz, 1H, 4-HH), 1,48 (s, 3H, CH₃), 1,40 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,50 (C), 154,02 (C), 83,45 (C), 70,04 (CH₂), 69,70 (CH₂), 63,45 (CH), 57,25 (CH), 52,83 (CH₃), 41,77 (CH), 37,85 (CH₃), 37,44 (CH₃), 28,91 (CH₂), 28,51 (3 CH₃).

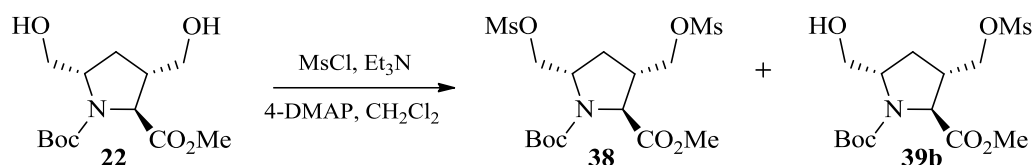
EM-IE m/z (%): 389 [(M + 1)⁺ - *t*-Bu, 1], 344 (M⁺ - Boc, 4), 286 [(M + 1)⁺ - (Boc + CO₂CH₃), 63], 236 (79), 234 (19), 190 (74), 140 (15), 138 (23), 91 (100), 80 (34), 79 (72), 68 (15), 67 (31), 59 (23), 58 (95), 57 (99).

EM-AR m/z : calculado para C₁₅H₂₇NO₁₀S₂, 445,1076; encontrado, 445,1088.





3.18. (\pm) -(2*R**,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis[[*(metilsulfonil)oxi*]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**38**) y (\pm) -(2*R**,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[[*(metilsulfunil)oxi*]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**39b**)



Siguiendo el mismo procedimiento antes descrito para la preparación de **35** (véase apartado 3.7), pero utilizando menor cantidad de cloruro de metilsulfonilo (proporción molar **22**/CIMs (1:2)) y tras el posterior fraccionamiento por cromatografía en columna sobre gel de sílice del residuo aceitoso obtenido empleando como eluyente hexano/AcOEt (1:3), se aisló en las primeras fracciones que contenían producto **38** con un rendimiento del 72% (cuyas propiedades físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las anteriormente descritas en el apartado 3.17) y en las siguientes **39b**, como un aceite incoloro con un rendimiento del 25%.

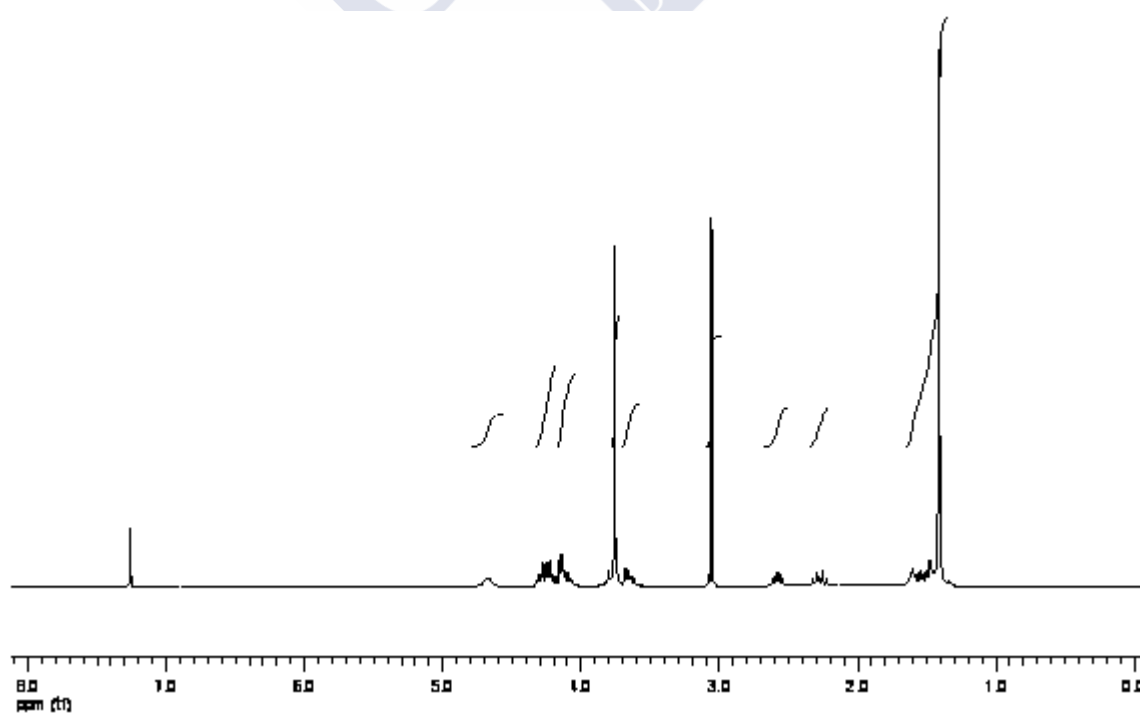
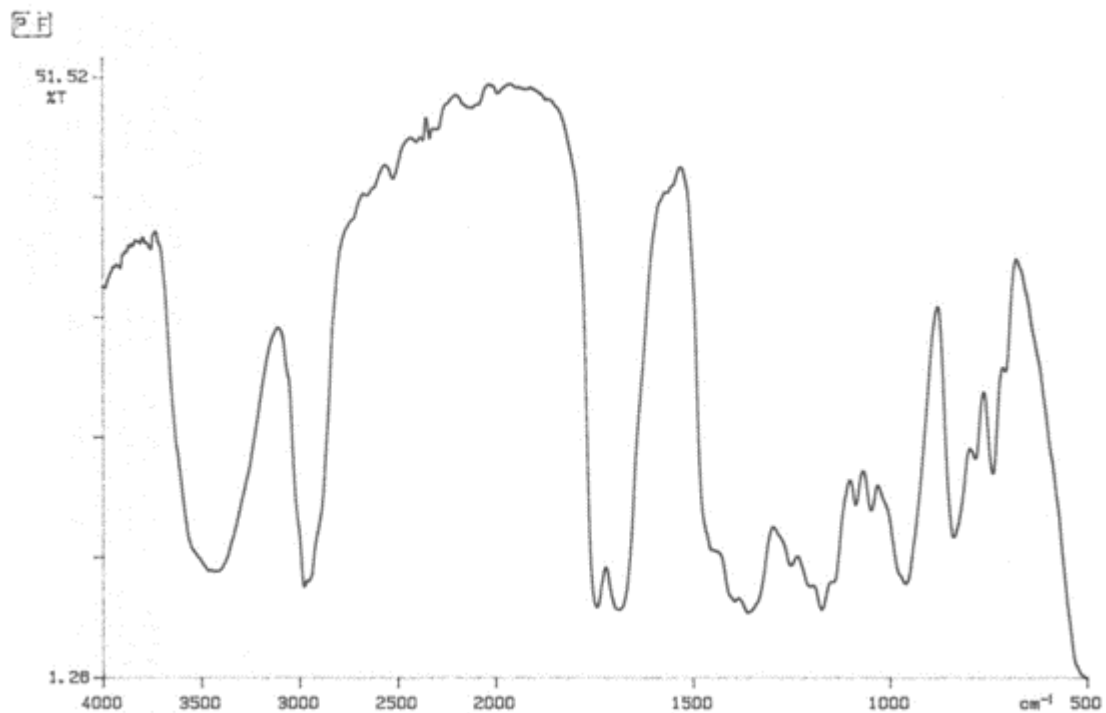
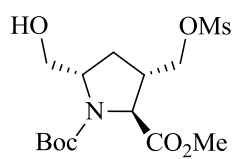
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3433, 2976, 1744, 1691, 1361, 1174, 1087, 1048, 960, 839.

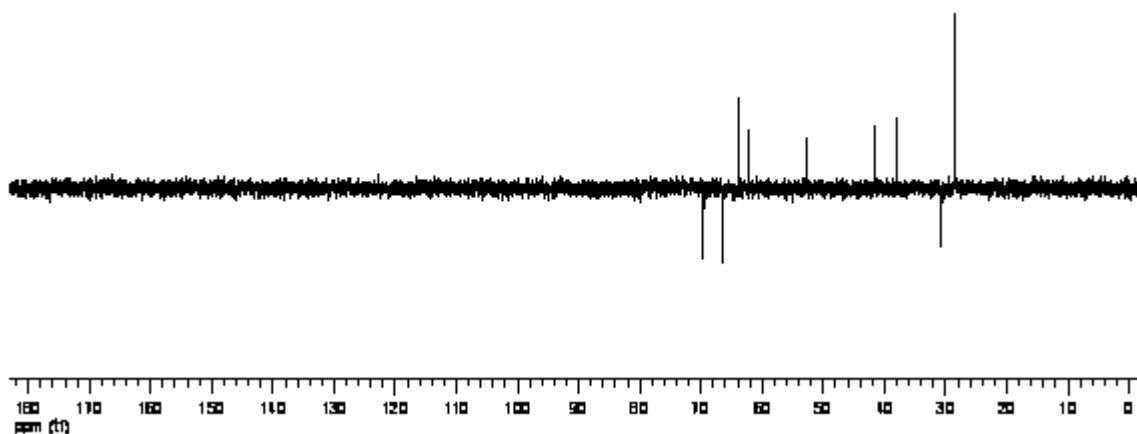
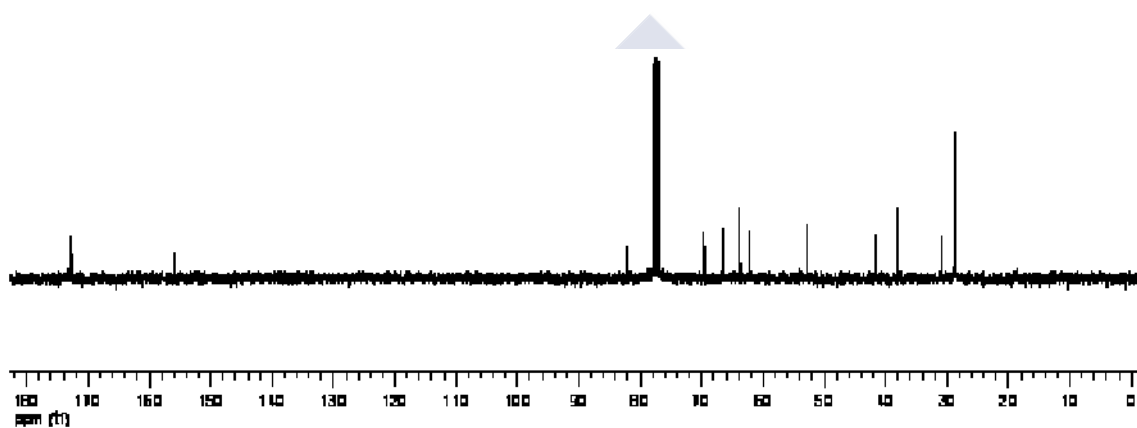
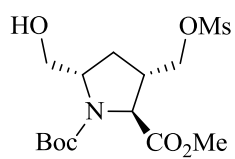
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,74-4,61 (m, 1H, 2-H), 4,25 (ddd, $J = 21,2, 10,2, 6,6$ Hz, 2H), 4,15-4,09 (m, 2H), 3,76 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,68-3,61 (m, 1H), 3,07 (s, 3H, SO₂CH₃), 2,59-2,56 (m, 1H), 2,28 (dt, $J = 13,2, 7,6$ Hz, 1H, 4-HH), 1,60-1,48 (m, 2H, uno de ellos intercambia con D₂O, 4-HH y OH), 1,41 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,74 (C), 156,01 (C), 82,22 (C), 69,59 (CH₂), 66,53 (CH₂), 63,73 (CH), 62,18 (CH), 52,77 (CH₃), 41,56 (CH), 37,96 (CH₃), 30,87 (CH₂), 28,54 (3 CH₃).

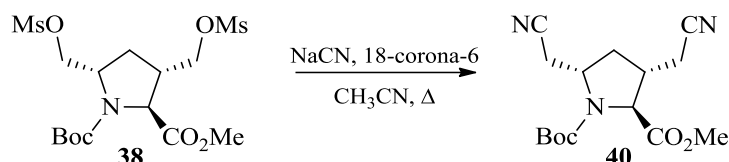
EM-IE m/z (%): 336 [$M^+ - OCH_3$], 5], 237 (9), 236 (88), 208 (10), 140 (19), 126 (17), 112 (29), 91 (14), 82 (13), 80 (37), 79 (15), 68 (15), 57 (100).

EM-AR m/z : calculado para C₁₄H₂₅NO₈S, 367,4152; encontrado, 367,4166.





3.19. (\pm)-(2*R,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis(cianometil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**40**)**



Sobre una disolución agitada de **38** (0,30 g, 0,11 mmol) en CH₃CN seco (3 mL) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se añadió NaCN (0,26 g, 5,38 mmol) y 18-corona-6 (0,03 g, 0,11 mmol), la mezcla de reacción resultante se calentó a 60 °C durante 23 h. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, sobre la masa de reacción se añadió Et₂O (25 mL) y el precipitado sólido formado se filtró y se lavó con Et₂O y AcOEt. La concentración a vacío del líquido filtrado, condujo a un residuo aceitoso (0,22 g) que se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna empleando como soporte gel de sílice y como eluyente hexano/AcOEt (2:1). De las fracciones que contenían producto se aisló **40** (0,13 g, 61%) como un sólido blanco, p.f. = 100–102 °C.

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 2876, 2372, 2251, 1757, 1695, 1401, 1352, 1208, 1138.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,14–4,06 (m, 2H, 2-H y 5-H), 3,74 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,24–3,16 (m, 1H), 2,93–2,86 (m, 1H), 2,68–2,52 (m, 4H), 1,80–1,76 (m, 1H, 4-HH), 1,46 (s, 3H, CH₃), 1,37 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,08 (C), 153,93 (C), 117,78 (C), 117,55 (C), 82,14 (C), 65,67 (CH), 54,89 (CH), 52,94 (CH₃), 38,68 (CH), 35,76 (CH₂), 28,43 (3 CH₃), 22,94 (CH₂), 21,73 (CH₂).

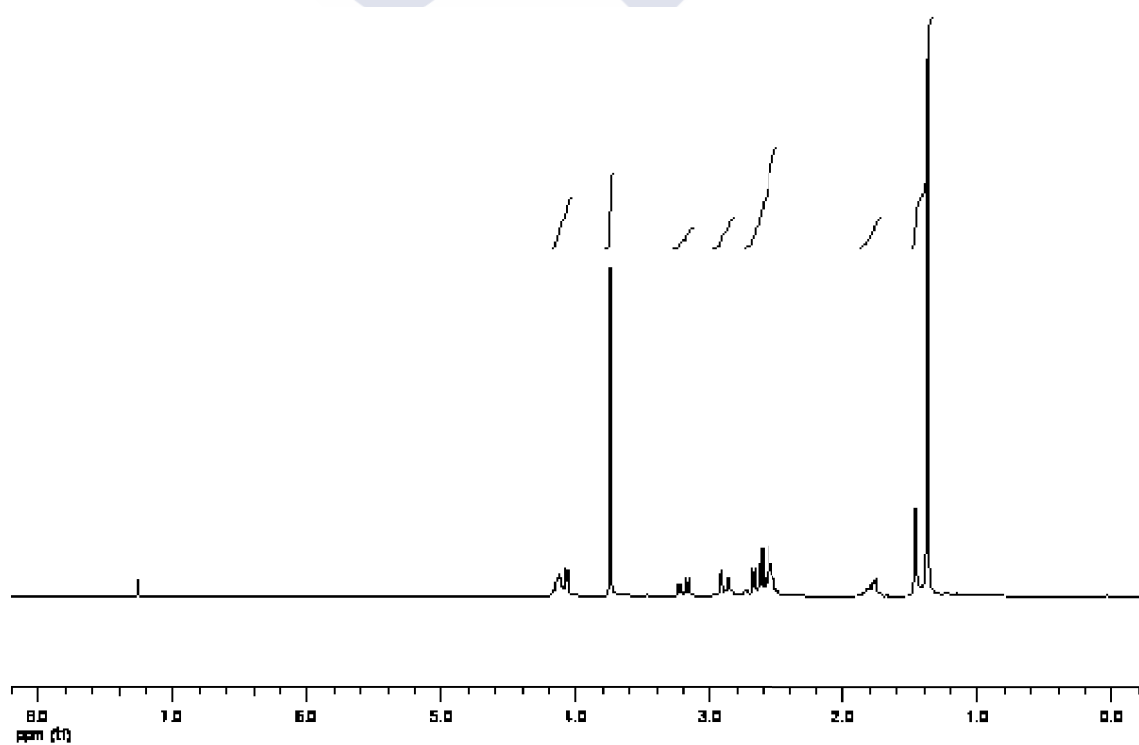
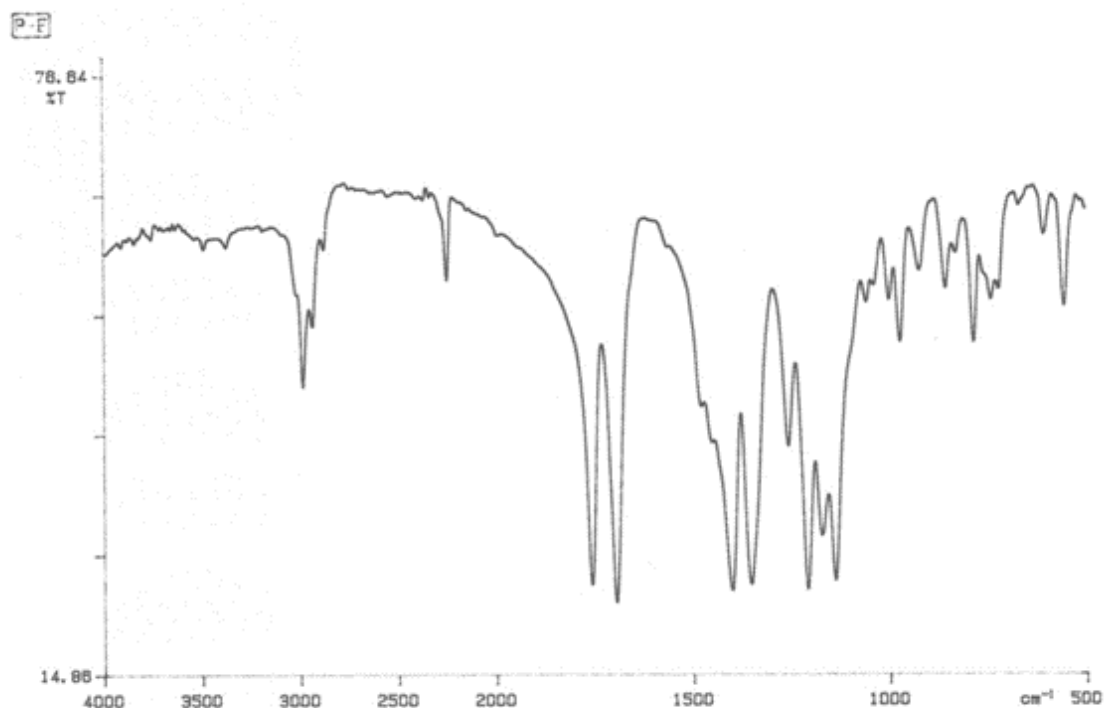
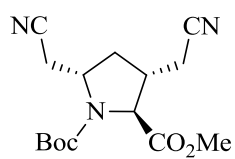
EM-IE m/z (%): 251 [(M + 1)⁺ - *t*-Bu, 1], 206 (19), 167 (13), 149 (10), 148 (100), 59 (9), 57 (63).

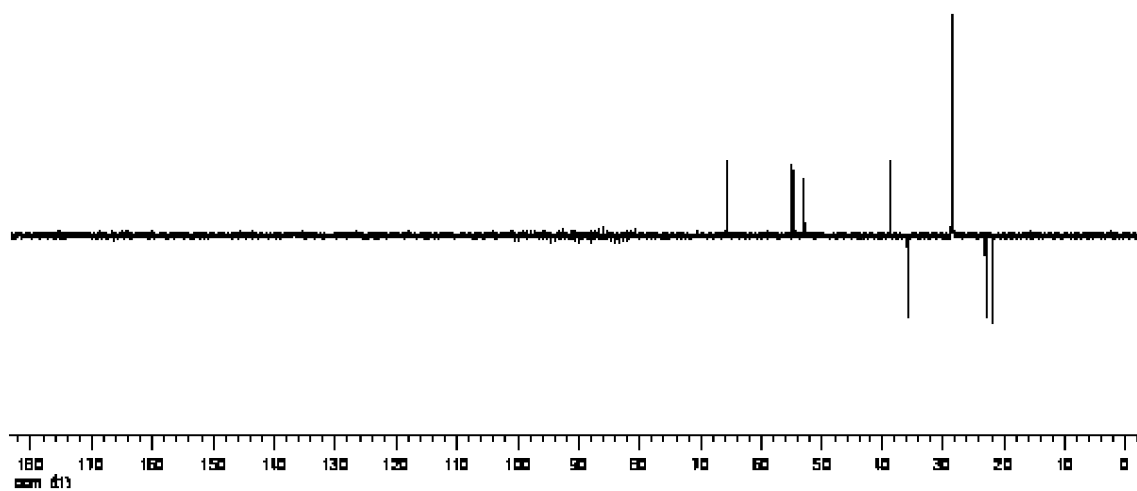
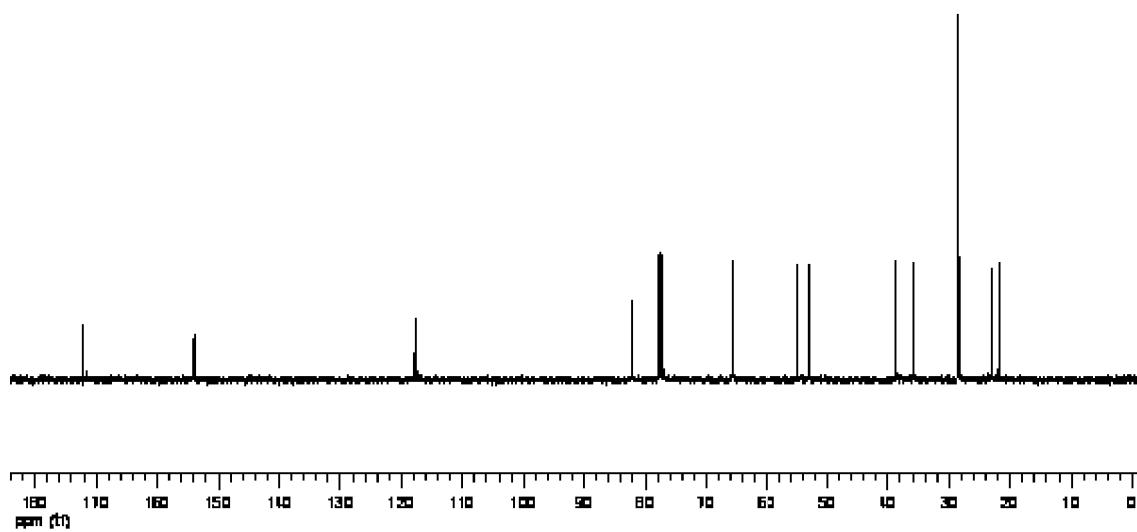
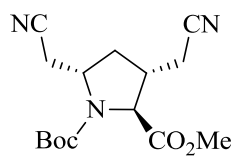
Microanálisis. Calculado para C₁₅H₂₁N₃O₄ (307,34): C 58,62, H 6,89, N 13,67. Encontrado: C 58,94, H 6,76, N 13,83.

Un monocristal adecuado para análisis por difracción de rayos X, se consiguió mediante disolución de una pequeña porción de **40** en la menor cantidad posible de acetona en un vial abierto, situado en el interior de otro de mayor tamaño, cerrado y con un poco de pentano en su base, tras permanecer algunos días en un lugar fresco, oscuro y sin vibraciones.

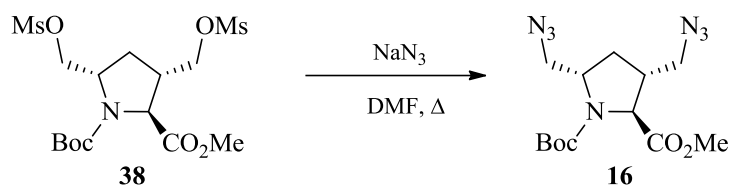
Tabla 4. Datos del cristal y refinamiento de la estructura de 40²¹⁸	
Fórmula empírica	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₄
Peso fórmula	307,35
Temperatura	100,0 K
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C 2/c
Dimensiones de la celdilla unidad	a = 20,7171 (8) Å b = 8,8276 (3) Å β = 111,073 (2)° c = 18,6784 (5) Å
Volumen	V = 3187,50 (18) Å ³
Z	8
Densidad (calculada)	1,281 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0,09 mm ⁻¹
F(000)	1312
Tamaño del cristal	0,49 × 0,36 × 0,3 mm ³
Intervalo de theta para la recogida de datos	2,1 a 26,4°
Intervalos de índices	h = -25→23, k = 0→11, l = 0→23
Reflexiones recogidas	20624
Reflexiones independientes	3241 [R(int) = 0,069]
Compleitud para theta = 26,39°	99,7 %
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz entera en F ²
Datos / restricciones / parámetros	3241 / 0 / 204
Bondad del ajuste en F²	1,02
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0429, wR2 = 0,098
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0656, wR2 = 0,1094
Máxima diferencia de pico y agujero	0,28 y -0,23 e.Å ⁻³

²¹⁸ Los datos cristalográficos del compuesto **40** han sido depositados en el Centro de Datos Criatolográficos de Cambridge como publicación privada CCDC 779237. Copias de estos datos pueden obtenerse libres de cargo en la aplicación del CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.





3.20. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (16)**



Sobre una disolución de **38** (1,81 g, 4,07 mmol) en DMF seca (150 mL) se añadió NaN₃ (2,64 g, 40,7 mmol), bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 4 h, tras las cuales se eliminó la DMF bajo presión reducida y el residuo resultante se repartió en H₂O (100 mL) y Et₂O (50 mL). La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 × 25 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 × 25 mL) y se secaron sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a vacío proporcionó un aceite amarillo (1,25 g) que se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt (3:1). Tras la eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto, se aisló **16** (1,10 g, 80%) como un sólido blanquecino, p.f. = 45–48 °C.

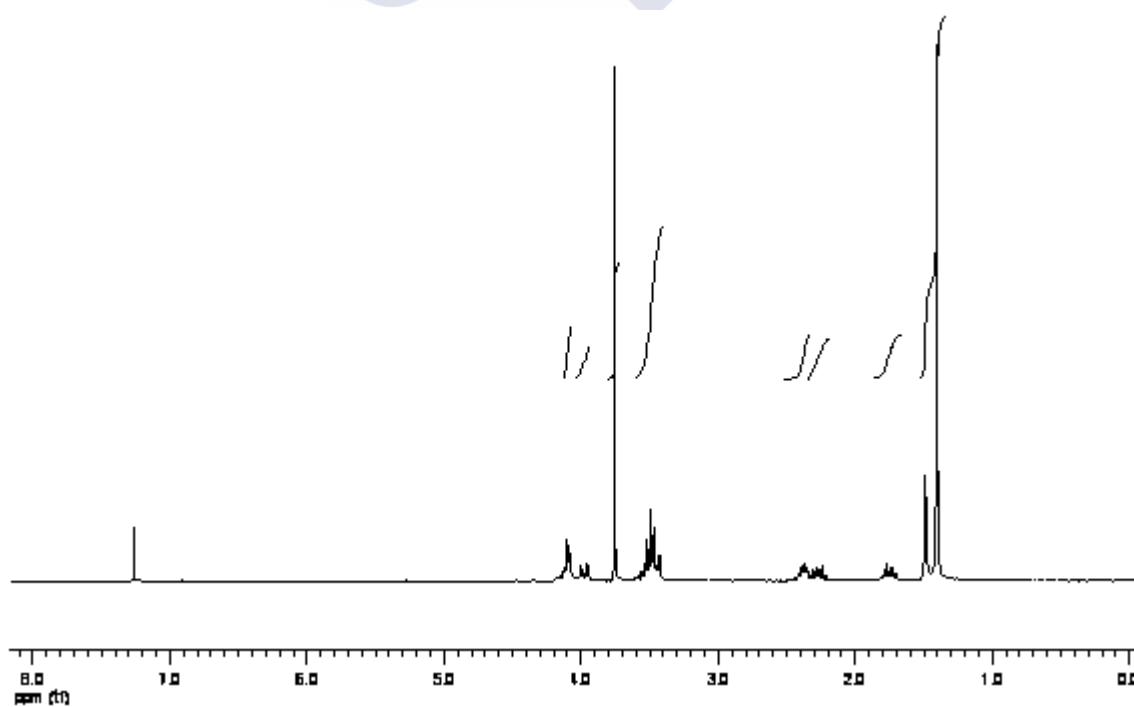
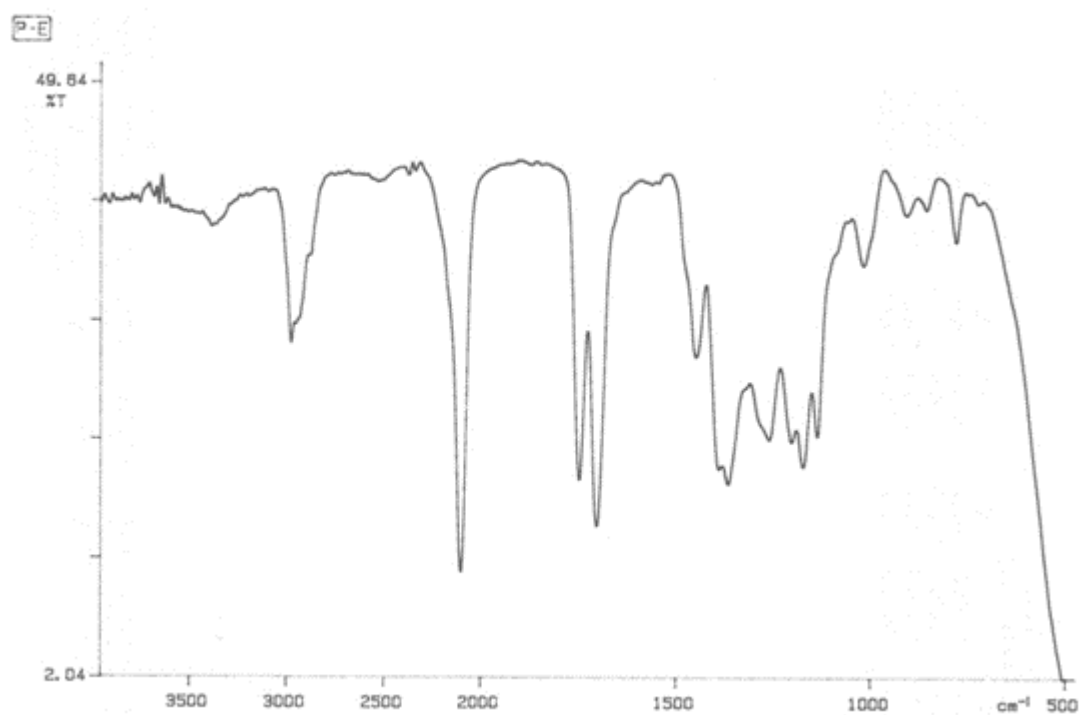
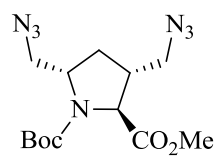
IR (KBr) ν (cm⁻¹): 2977, 2103, 1748, 1703, 1448, 1366, 1262, 1174, 1138.

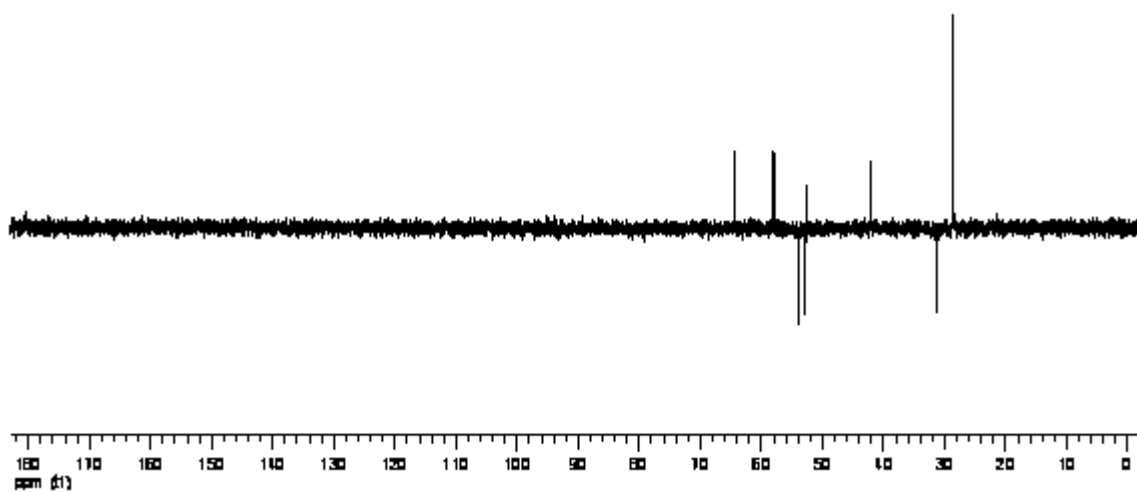
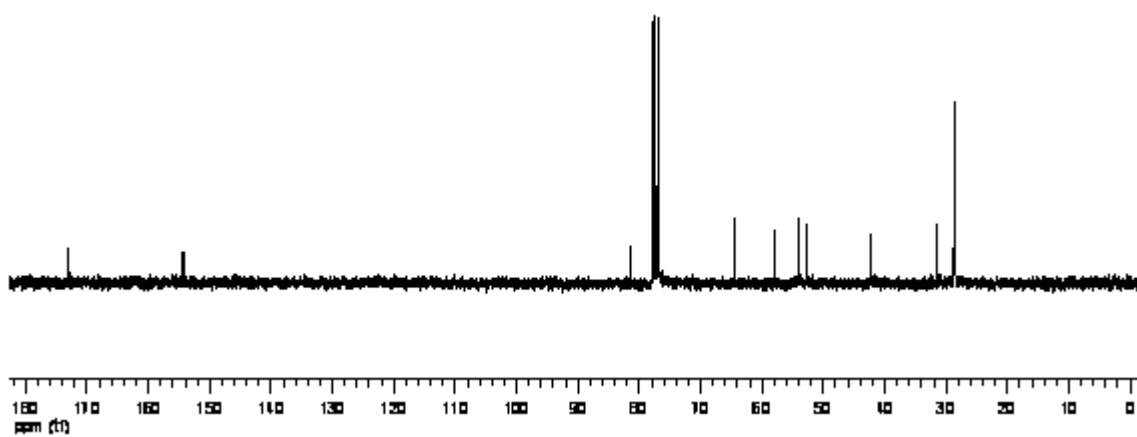
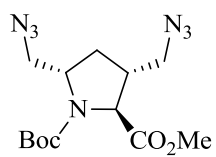
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,12-4,08 (m, 1H), 3,98 (dd, J = 12,4, 5,5 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,56-3,43 (m, 4H), 2,42-2,35 (m, 1H), 2,31-2,24 (m, 1H), 1,79-1,72 (m, 1H, 4-*H*H), 1,49 (s, 3H, CH₃), 1,40 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,50 (C), 155,21 (C), 82,35 (C), 64,38 (CH), 58,0 (CH), 53,92 (CH₂), 52,79 (CH₂), 52,69 (CH₃), 42,20 (CH), 31,42 (CH₂), 28,74 (CH₃), 28,56 (2 CH₃).

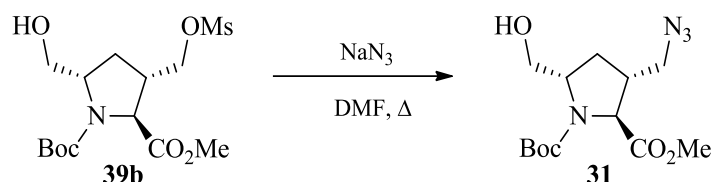
EM-IE m/z (%): 283 [(M + 1)⁺ - *t*-Bu, 8], 183 (68), 126 (12), 80 (12), 68 (21), 59 (11), 57 (100).

Microanálisis. Calculado para C₁₃H₂₁N₇O₄ (339,35): C 46,01, H 6,24, N 28,89. Encontrado: C 46,33, H 6,19, N 29,07.





3.21. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3-(Azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (31)**



Para la preparación de **31** se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la preparación de **16** (véase apartado 3.20), utilizando **39b** (0,41 g, 1,12 mmol) y NaN₃ (0,36 g, 5,58 mmol). Tras la elaboración habitual y posterior purificación del residuo obtenido (0,32 g) por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente hexano/AcOEt (1:1), se aisló **31** (0,31 g, 88%) como un aceite incoloro.

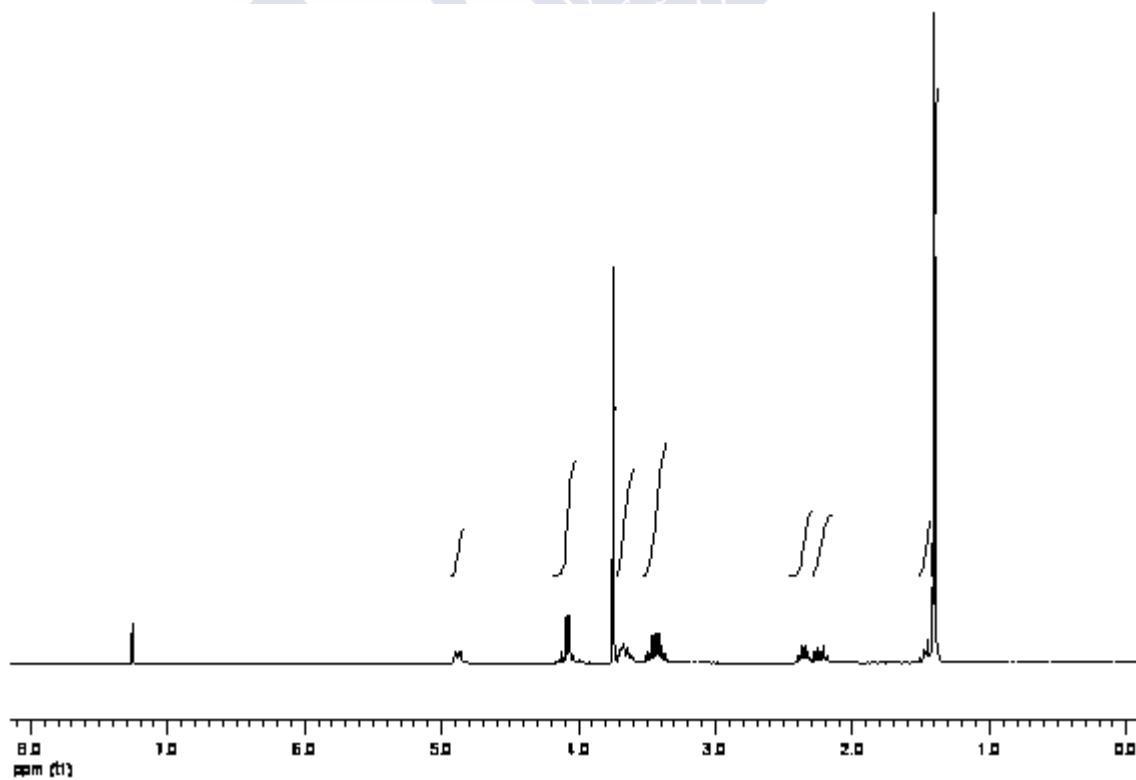
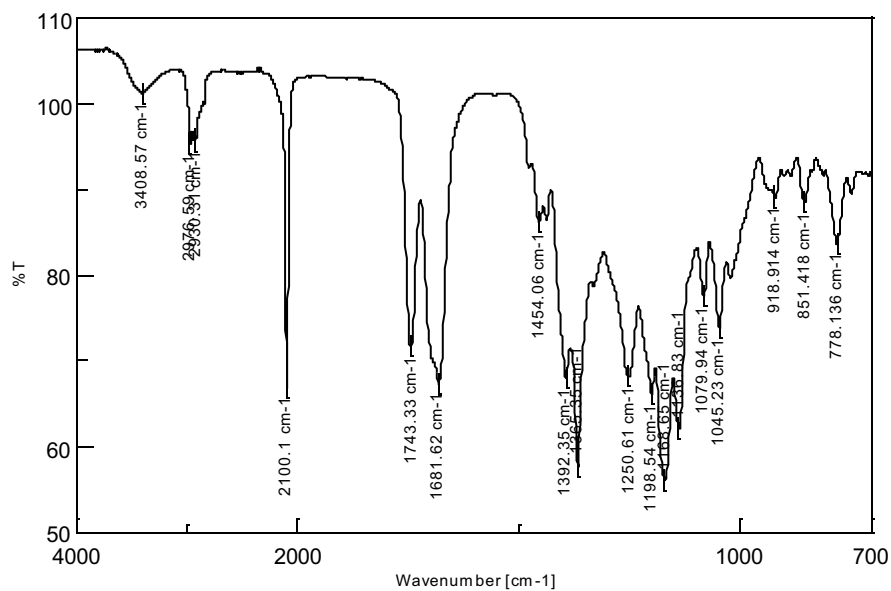
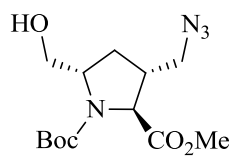
IR v (cm⁻¹): 3408, 2976, 2100, 1743, 1681, 1454, 1392, 1365, 1198, 1168, 1137.

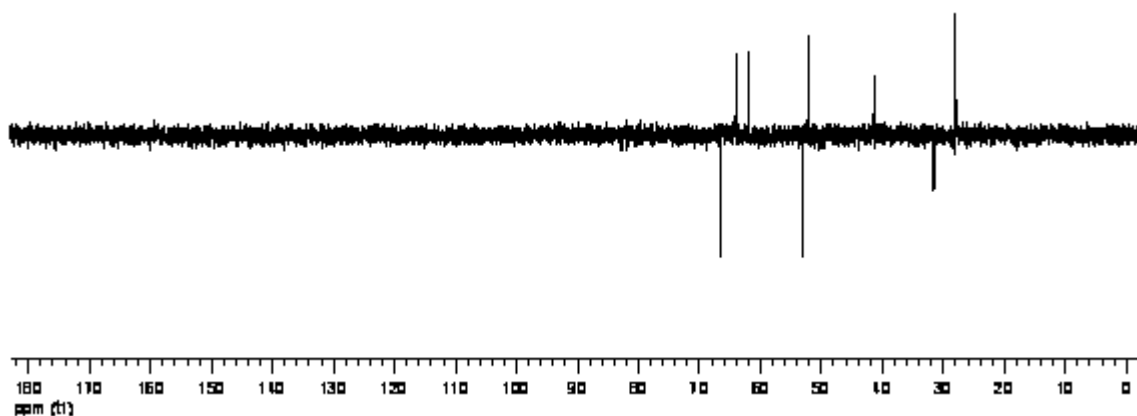
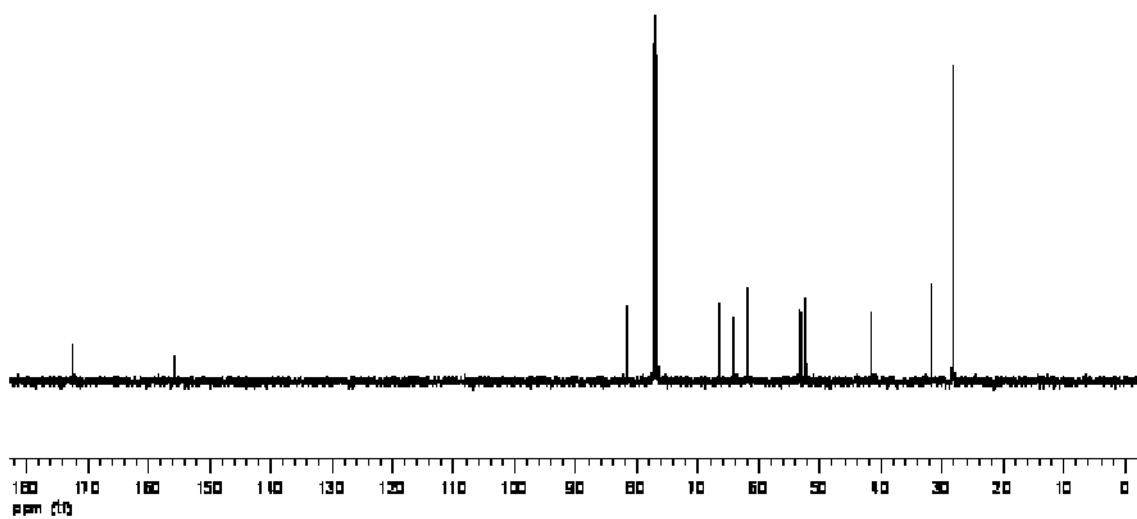
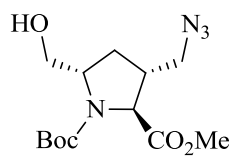
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,88 (dd, *J* = 9,1, 2,5 Hz, 1H, intercambia con D₂O, OH), 4,12-3,99 (m, 2H), 3,75 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,69-3,61 (m, 2H), 3,47 y 3,39 (parte AB de un sistema ABM, *J* = 22,9, 18,9, 12,6 Hz, 2H, CH₂OH), 2,36 (dd, *J* = 13,2, 6,6 Hz, 1H, 4-*HH*), 2,33 (dt, *J* = 13,1, 7,5 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,50-1,44 (m, 1H), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,59 (C), 155,82 (C), 81,68 (C), 66,53 (CH₂), 64,09 (CH), 62,0 (CH), 53,26 (CH₂), 52,26 (CH₃), 41,49 (CH), 31,66 (CH₂), 28,12 (3 CH₃).

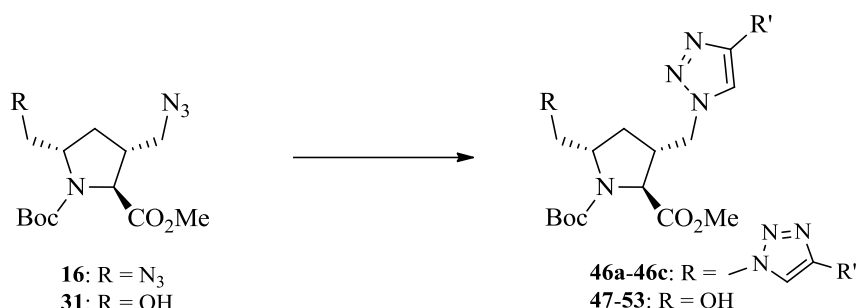
EM-IE-TDV *m/z* (%): 337 [(M + Na)⁺, 31], 316 [(M + 2)⁺, 58], 288 (100), 215 (50), 172 (15).

EM-AR *m/z*: calculado para C₁₃H₂₂N₄O₅, 314,1590; encontrado, 314,1540.





3.22. Procedimiento general para la síntesis de los triazolil derivados 46a-46c y 47-53



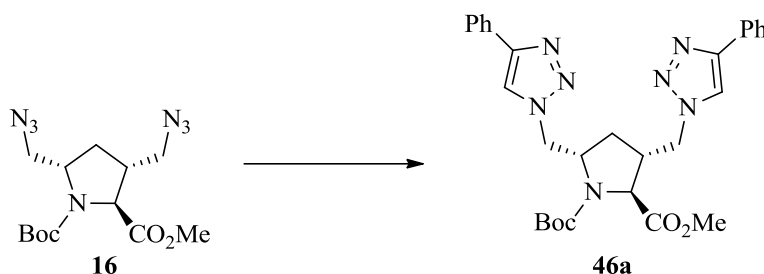
3.22.1. Método A: reacción de Huisgen catalizada por cobre(I)

Sobre una disolución de **16** o **31** (0,85 mmol) en tolueno (3,5 mL) y *t*-BuOH (1 mL) bajo atmósfera de argón, se añade el alquino correspondiente (1–2 mmol), CuI (0,043 mmol) y DIEA (1,75 mmol). La mezcla de reacción se agita a reflujo entre 15–72 h, según los casos. La eliminación de los disolventes bajo presión reducida proporciona un residuo sólido, que se purifica por recristalización o por cromatografía en columna sobre gel de sílice.

3.22.2. Método B: reacción de Huisgen asistida por microondas

Sobre una disolución de **16** o **31** (1 mmol) en *t*-BuOH (1 mL) dispuesta en un tubo reactor, se añade el alquino correspondiente (1,1–2,2 mmol), H₂O (1 mL), NaAsc (0,5 mmol) y CuSO₄·5H₂O (0,05 mmol). La mezcla de reacción se calienta entre 70 y 90 °C y se irradia a 100 W entre 10–160 min. La eliminación de los disolventes bajo presión reducida proporciona un residuo sólido que se purifica por recristalización o por cromatografía en columna sobre gel de sílice.

3.22.3. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis-[(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil]-pirrolidina-2-carboxilato de metilo (46a)**



Método A. Arilalquino: fenilacetileno. 70 °C, 15 h. Sólido blanco, Rdto. = 87%; p.f. = 238–242 °C (AcOEt).

IR v (cm⁻¹): 3082, 2978, 1744, 1710, 1351, 1200, 1142, 765.

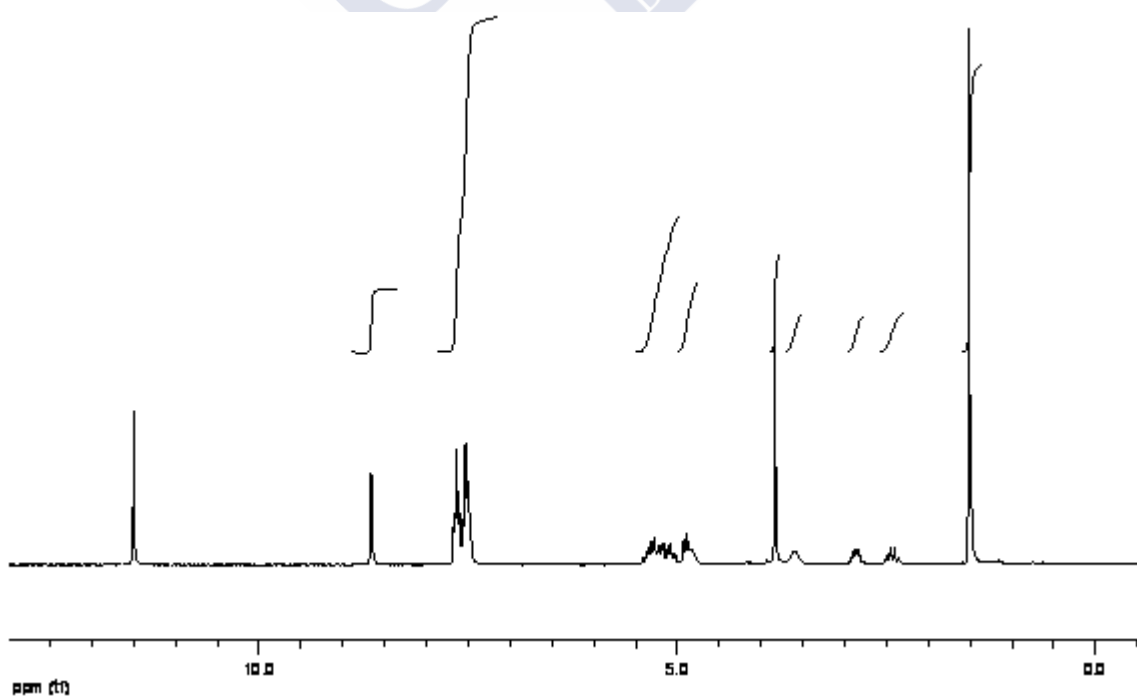
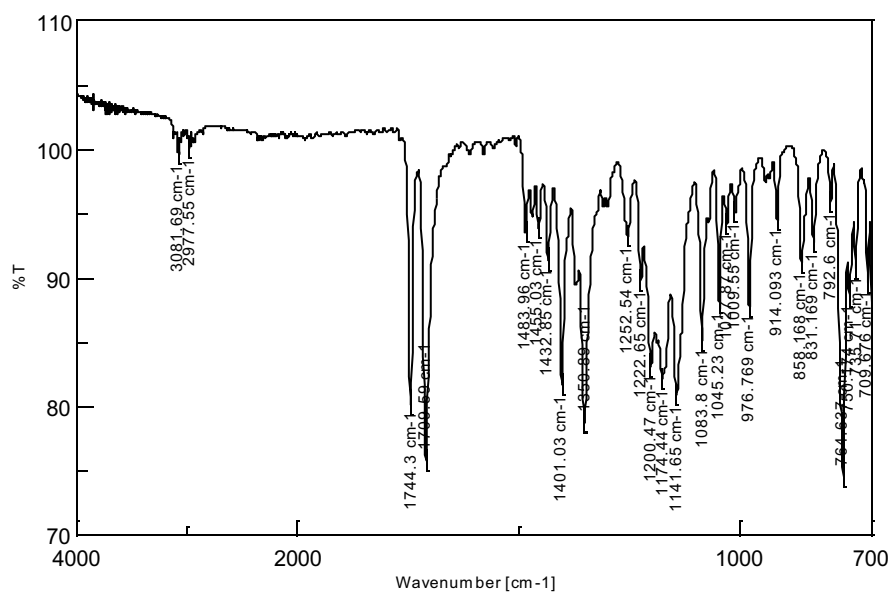
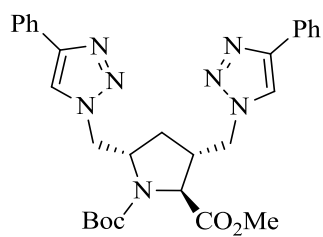
¹H RMN (TFA-*d*₁) δ (ppm): 8,64 (s, 2H, 5-*H*_{triazolilo} y 5'-*H*_{triazolilo}), 7,67-7,46 (m, 10H, 2 Ph), 5,31-5,07 (m, 4H), 4,87-4,78 (m, 2H), 3,79 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,57-3,50 (m, 1H), 2,90-2,80 (m, 1H, 4-*HH*), 2,44-2,34 (m, 1H, 4-*HH*), 1,48 (s, 9H, 3 CH₃).

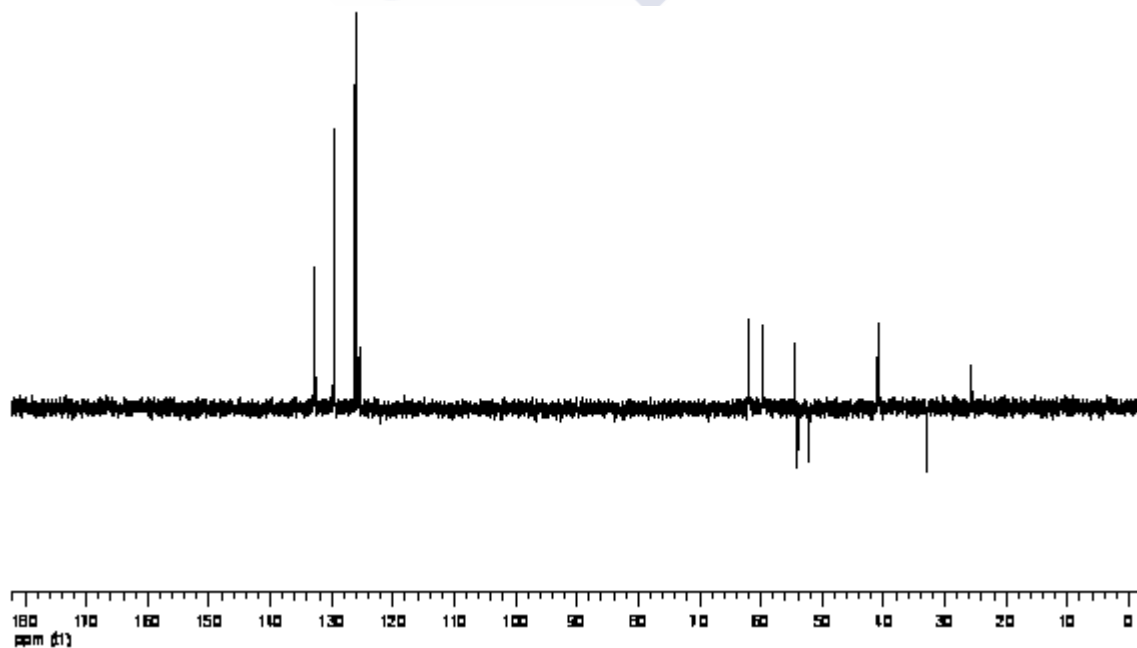
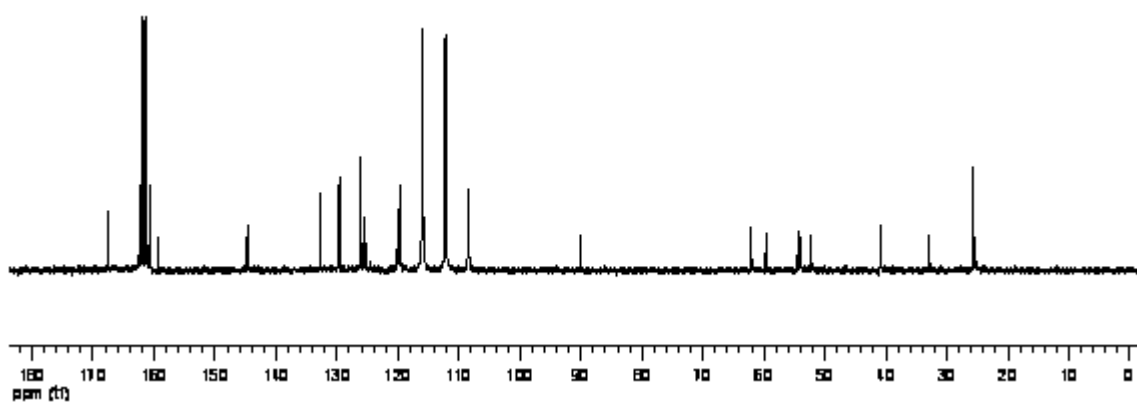
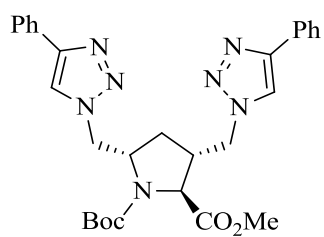
¹³C RMN (TFA-*d*₁) δ (ppm): 167,52 (C), 159,31 (C), 144,98 (C), 144,64 (C), 132,72 (CH), 129,60 (CH), 126,12 (CH), 125,66 (CH), 125,41 (CH), 120,04 (C), 120,17 (C), 90,10 (C), 62,07 (CH), 59,70 (CH), 54,44 (CH₃), 54,03 (CH₂), 52,29 (CH₂), 40,90 (CH), 32,90 (CH₂), 25,66 (3 CH₃).

EM-IQ *m/z* (%): 544 [(M + 1)⁺, 100].

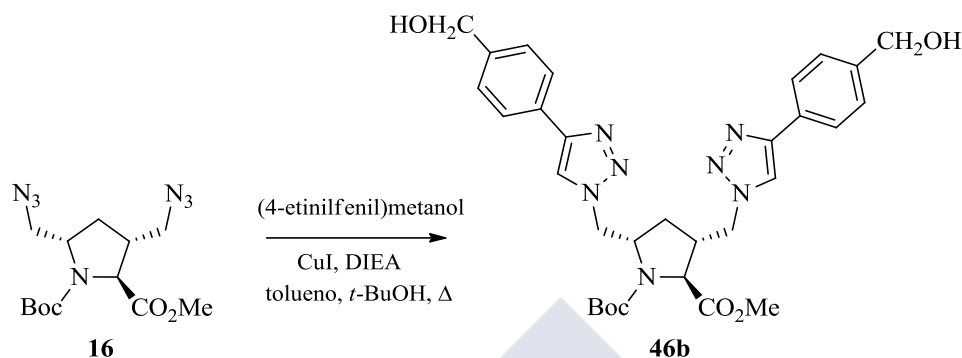
Microanálisis. Calculado para C₂₉H₃₃N₇O₄ (543,62): C 64,07, H 11,6, N 18,04. Encontrado: C 64,31, H 11,54, N 18,26.

Método B. 70 °C, 100 W, 15 min. Sólido blanco, Rdto. = 92%, datos físicos y espectroscópicos idénticos a los de la muestra obtenida por el *Método A*.





3.22.4. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis-[[[4-(4-hidroximetil)fenil]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (46b)**



Método A. Arilalquino: (4-etinilfenil)metanol. Reflujo, 17 h. Sólido blanco, Rdto. = 60%; p.f. = 227–229 °C (AcOEt/EtOH).

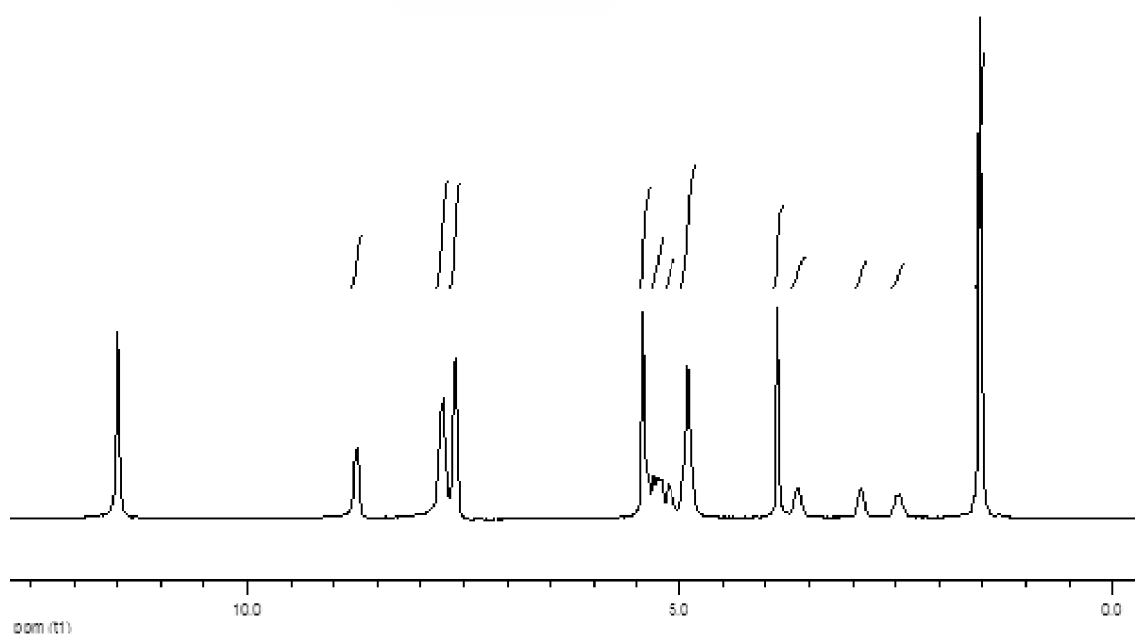
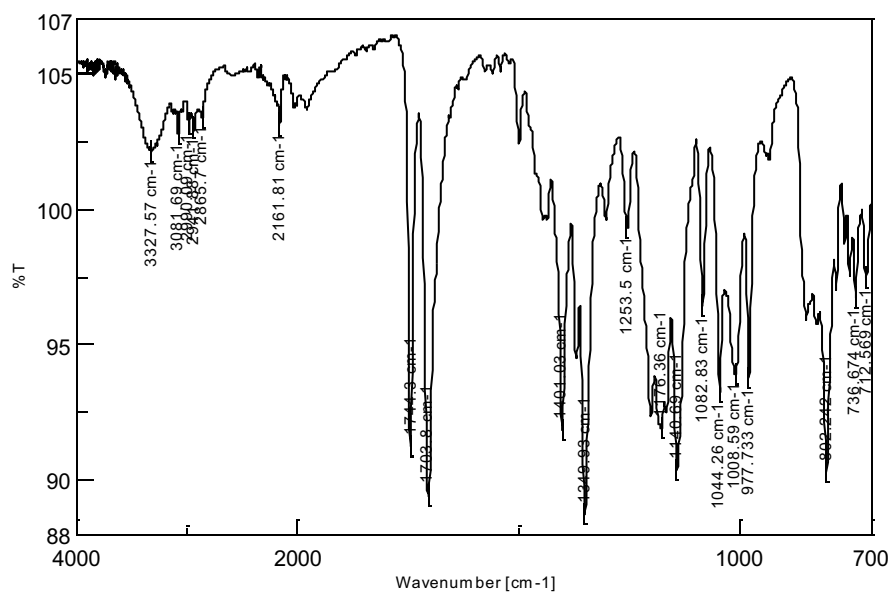
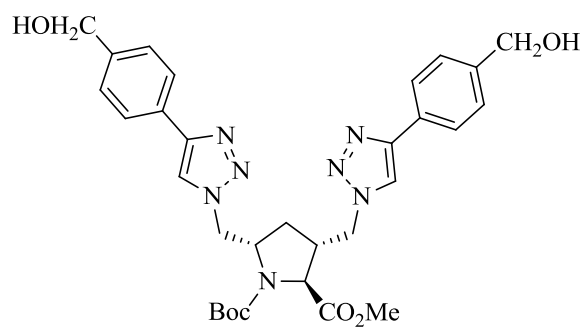
IR ν (cm⁻¹): 3327, 2941, 1744, 1704, 1401, 1350, 1176, 1141, 1044, 1009, 978, 802.

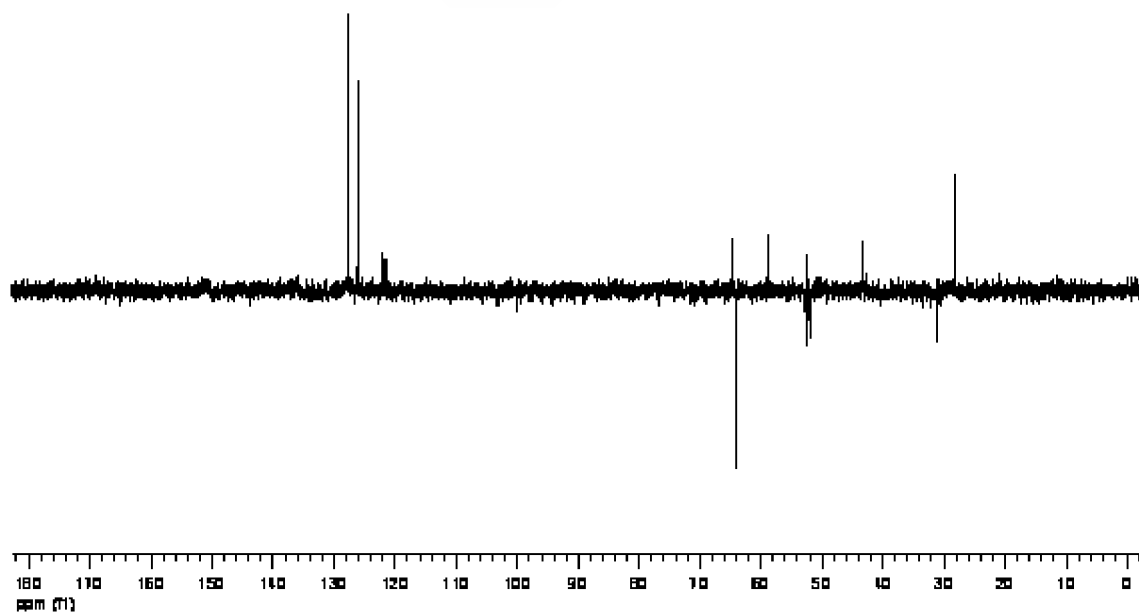
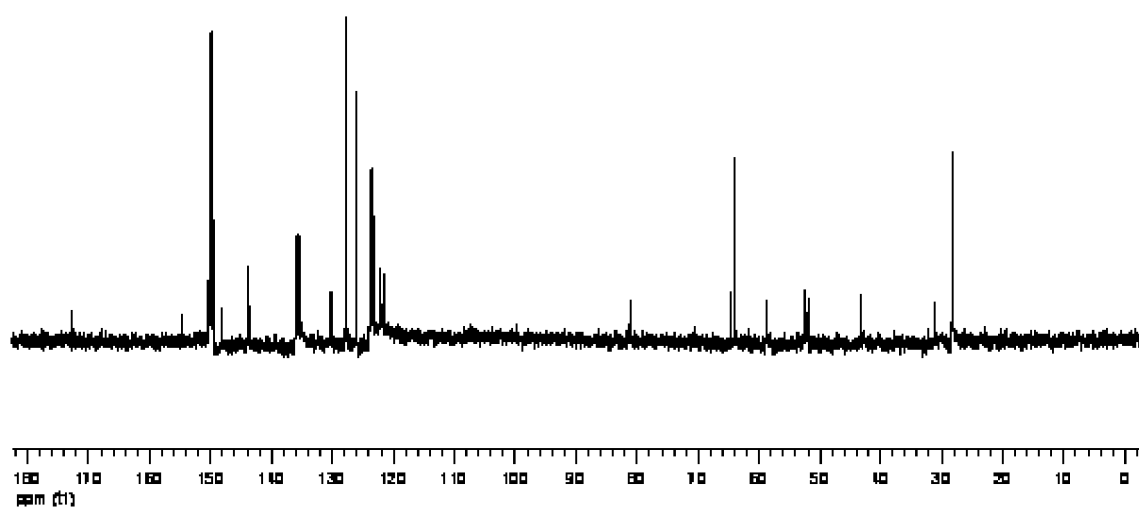
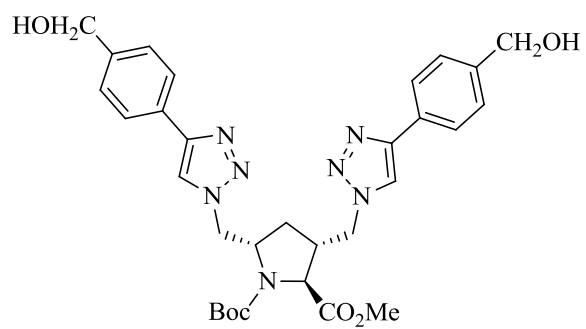
¹H RMN (TFA-*d*₁) δ (ppm): 8,75 y 8,73 (2s, 2H, 5-*H*_{triazolilo} y 5'-*H*_{triazolilo}), 7,78-7,74 (m, 4H, 3-*H*, 5-*H*, 3'-*H* y 5'-*H*_{fenilo}), 7,60 (s, 4H, 2-*H*, 6-*H*, 2'-*H* y 6'-*H*_{fenilo}), 5,44-5,38 (m, 4H), 5,31-5,22 (m, 2H), 5,13-5,10 (m, 1H), 4,90 (s, 5H, 2 *CH*₂OH), 3,87 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,64-3,62 (m, 1H), 2,91-2,89 (m, 1H, 4-*HH*), 2,53-2,41 (m, 1H, 4-*HH*), 1,53 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 172,84 (C), 154,73 (C), 148,14 (C), 148,02 (C), 143,72 (2 C), 130,23 (C), 130,19 (C), 127,68 (4 CH), 126,10 (4 CH), 122,16 (CH), 121,61 (CH), 81,11 (C), 64,61 (CH), 64,10 (2 CH₂), 58,84 (CH), 52,60 (CH₂), 52,40 (CH₃), 51,99 (CH₂), 43,31 (CH), 31,25 (CH₂), 28,18 (3 CH₃).

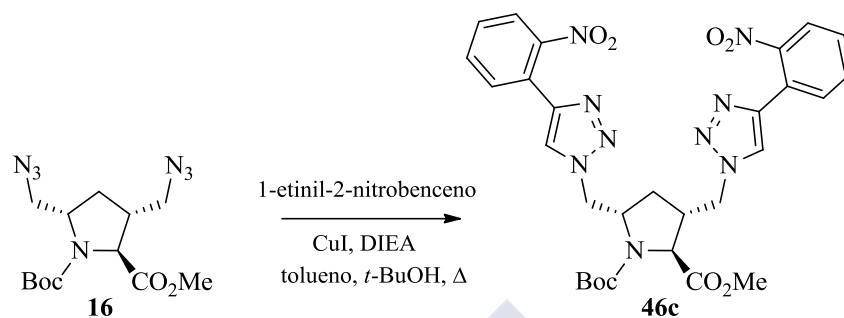
EM-BAR m/z (%): 604 [(M + 1)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₃₁H₃₇N₇O₆ (603,67): C 61,68, H 6,18, N 16,24. Encontrado: C 61,97, H 6,31, N 16,53.





3.22.5. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis-[[4-(2-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (46c)**



Método A. Arilalquino: 1-etinil-2-nitrobenceno. Reflujo durante 72 h. Sólido amarillo claro, Rdto. = 57%; p.f. = 118–119 °C después de purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (1:1).

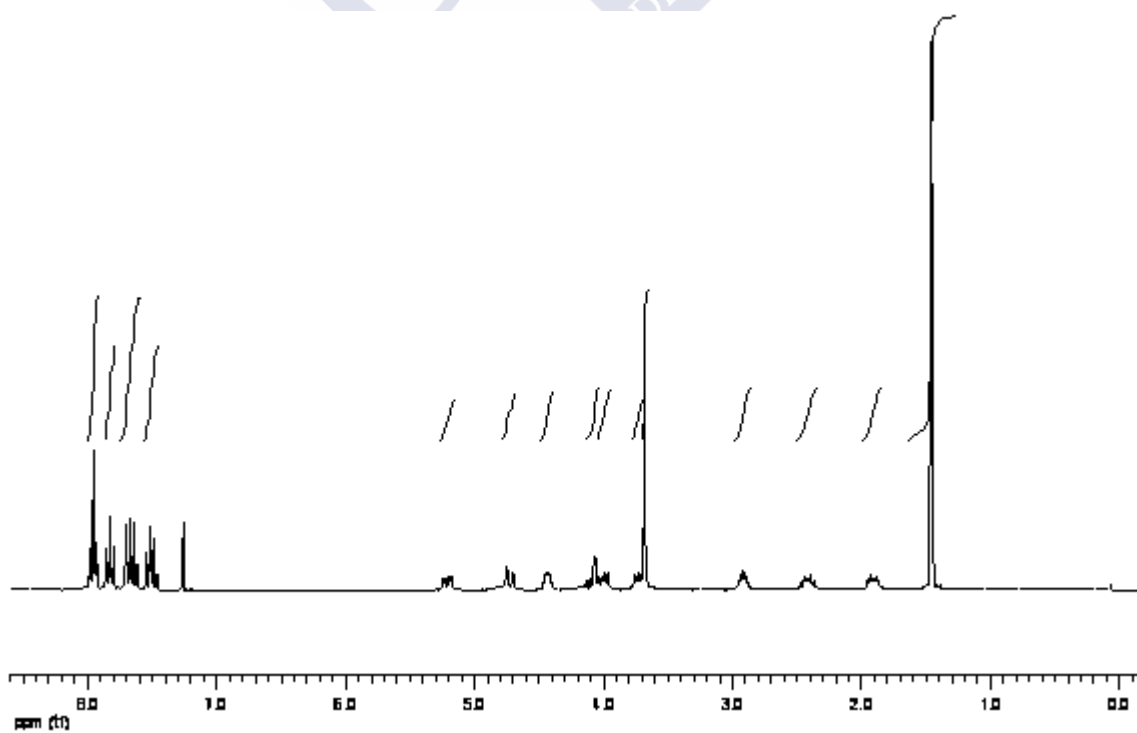
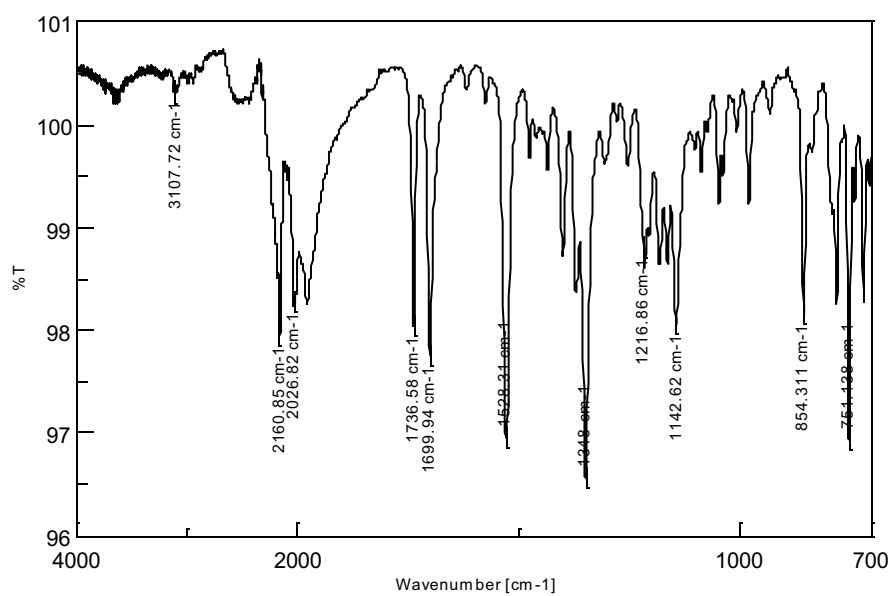
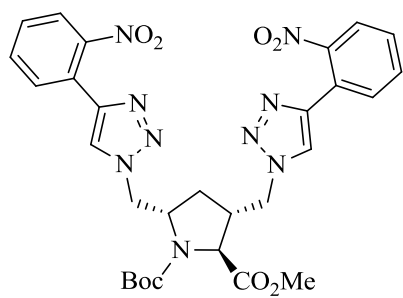
IR ν (cm⁻¹): 3108, 1736, 1700, 1528, 1348, 1217, 1176, 1143, 854, 751.

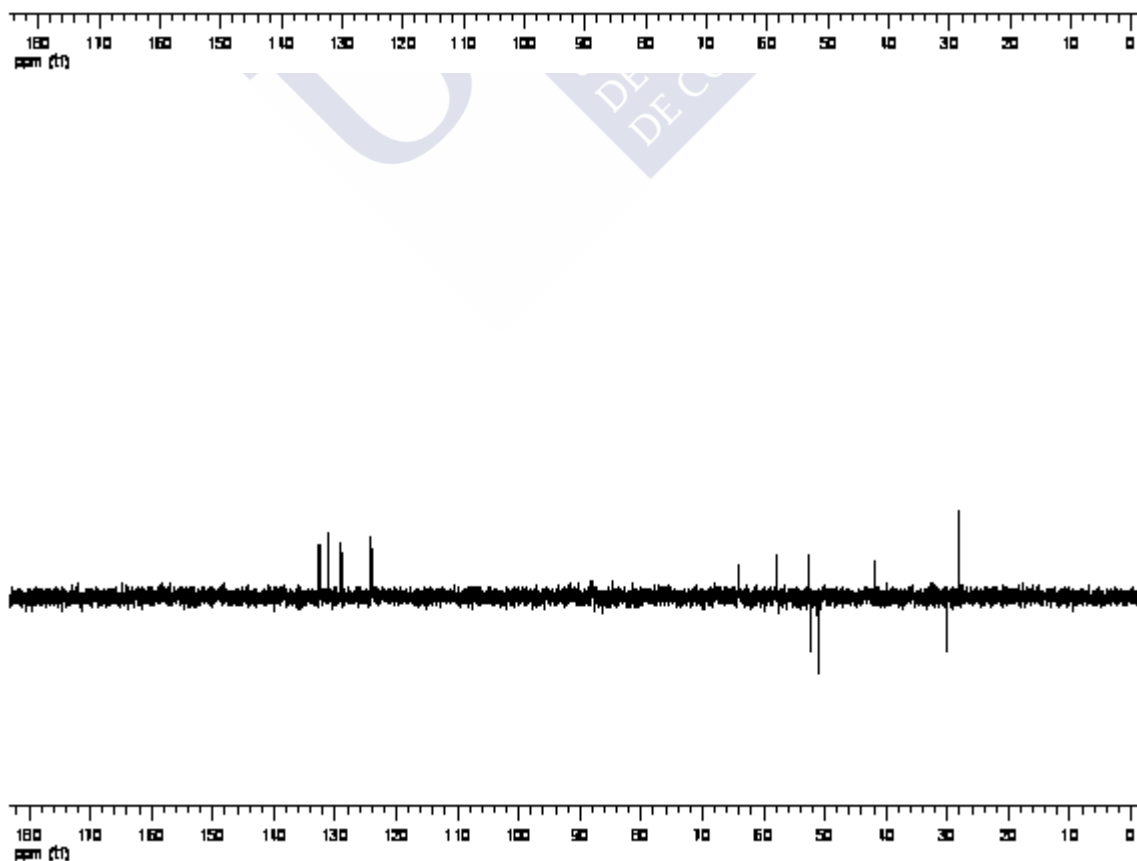
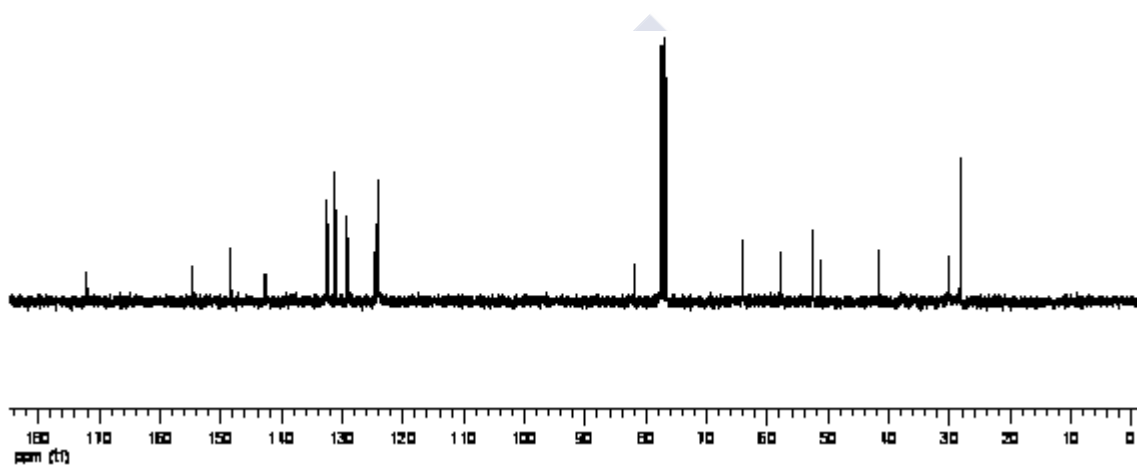
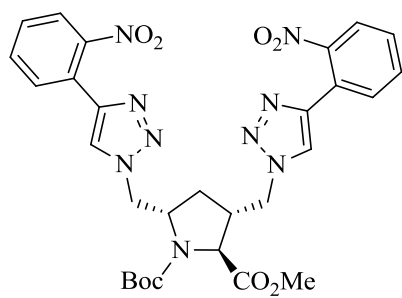
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,98-7,93 (m, 3H), 7,86-7,80 (m, 2H), 7,70-7,62 (m, 3H), 7,54-7,46 (m, 2H), 5,21 (dd, J = 14,0, 4,9 Hz, 1H), 4,73 (d, J = 13,8 Hz, 1H), 4,47-4,41 (m, 1H), 4,10-4,05 (m, 1H), 4,0 (dd, J = 13,8, 7,7 Hz, 1H), 3,76-3,71 (m, 1H, 5-H), 3,68 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,94-2,88 (m, 1H, 3-H), 2,42 (dt, J = 14,1, 9,0 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,91 (dt, J = 14,0, 5,5 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,46 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,07 (C), 155,65 (C), 148,43 (C), 148,36 (C), 142,70 (2 C), 132,67 (CH), 132,44 (CH), 131,21 (CH), 131,16 (CH), 129,24 (CH), 128,95 (CH), 124,65 (CH), 124,27 (CH), 124,14 (CH), 124,04 (CH), 81,88 (C), 64,03 (CH), 57,92 (CH), 52,53 (CH₃), 52,42 (CH₂), 51,13 (CH₂), 41,73 (CH), 30,09 (CH₂), 28,07 (3 CH₃).

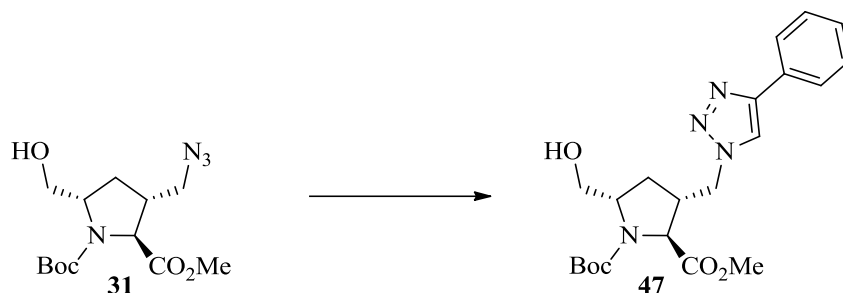
EM-BAR m/z (%): 634 [($M + 1$)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₂₉H₃₁N₉O₈ (633,61): C 54,97, H 4,93, N 19,90. Encontrado: C 55,32, H 5,08, N 19,65.





3.22.6. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3-[(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil]-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (47)**



Método A. Arilalquino: fenilacetileno. 70 °C, 22 h. Sólido blanco, Rdto. = 70%; p.f. = 138–141 °C después de purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (1:1).

IR v (cm⁻¹): 3051,3081, 2978, 2949, 1746, 1697, 1485, 1455, 1433, 1401, 1349, 1253, 1199, 1177, 1136, 1082, 1045, 978, 859, 783, 767.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,85-7,80 (m, 3H, 2-H_{fenilo}, 6- H_{fenilo} y 5-H_{triazolilo}), 7,46-7,38 (m, 2H, 3-H y 5- H_{fenilo}), 7,37-7,31 (m, 1H, 4- H_{fenilo}), 4,61(dd, *J* = 13,8, 6,9 Hz, 1H), 4,48 (dd, *J* = 13,8, 8,1Hz, 1H), 4,16-4,08 (m, 2H), 3,87-3,83 (m, 1H), 3,73-3,62 (m, 1H), 3,69 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,83 (dd, *J* = 13,2, 6,8 Hz, 1H, 4-*HH*), 2,23 (dt, *J* = 13,8, 7,6 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,67 (s an, 1H, intercambia con D₂O, OH), 1,56-1,45 (m, 1H), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,28 (C), 155,44 (C), 147,93 (C), 130,26 (C), 128,90 (2 CH), 128,35 (CH), 125,72 (2 CH), 120,12 (CH), 81,73 (C), 65,64 (CH₂), 64,27 (CH), 61,66 (CH), 52,38 (CH₃), 52,31 (CH₂), 42,32 (CH), 31,48 (CH₂), 28,14 (3 CH₃).

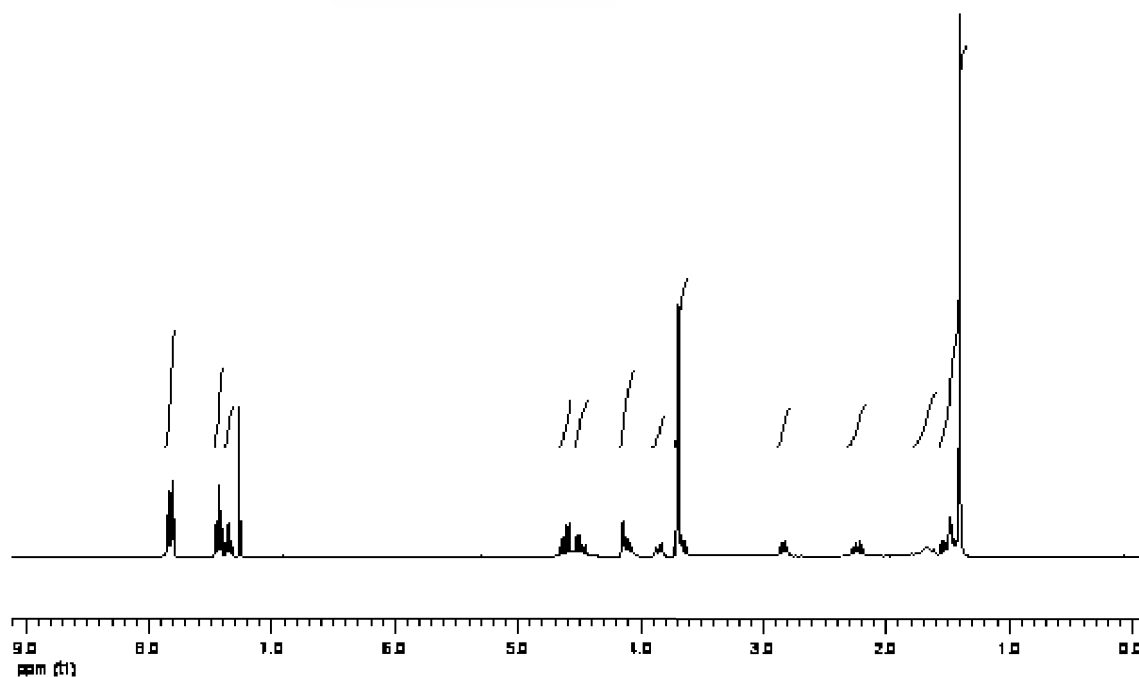
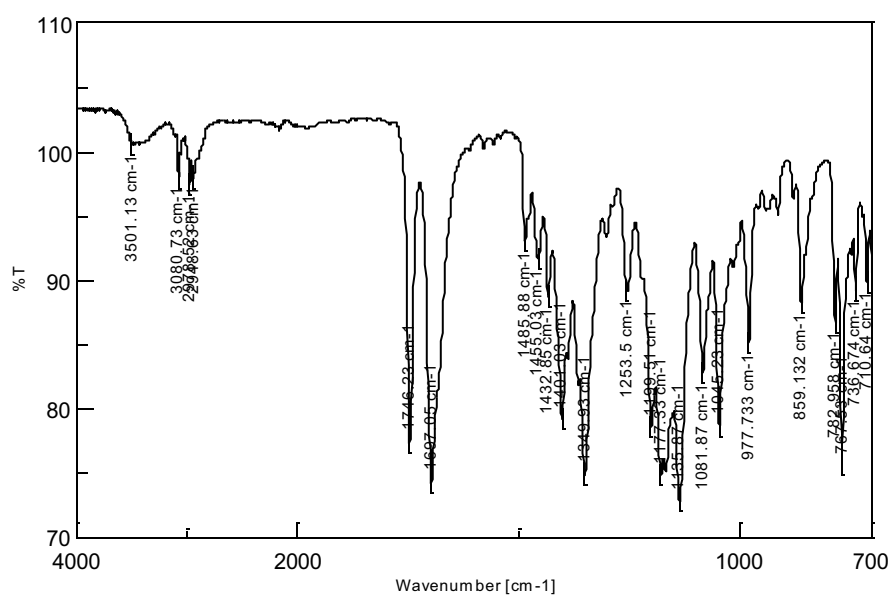
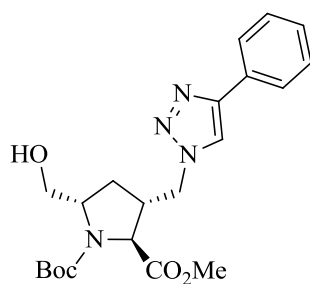
EM-IE *m/z* (%): 416 (M⁺, 7), 386 (9), 385 (15), 343 (21), 330 (9), 329 (16), 317 (9), 316 (50), 286 (25), 285 (100), 257 (25), 171 (19), 170 (26), 159 (25), 146 (30), 141 (14), 140 (99), 138 (15), 130 (30), 126 (17), 117 (18), 116 (26), 112 (62), 103 (18), 102 (26), 94 (17), 82 (16), 80 (13), 57 (33).

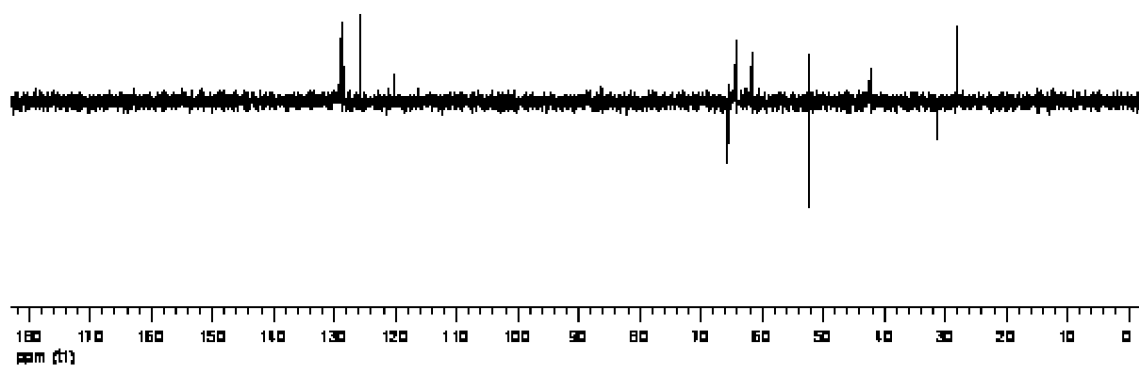
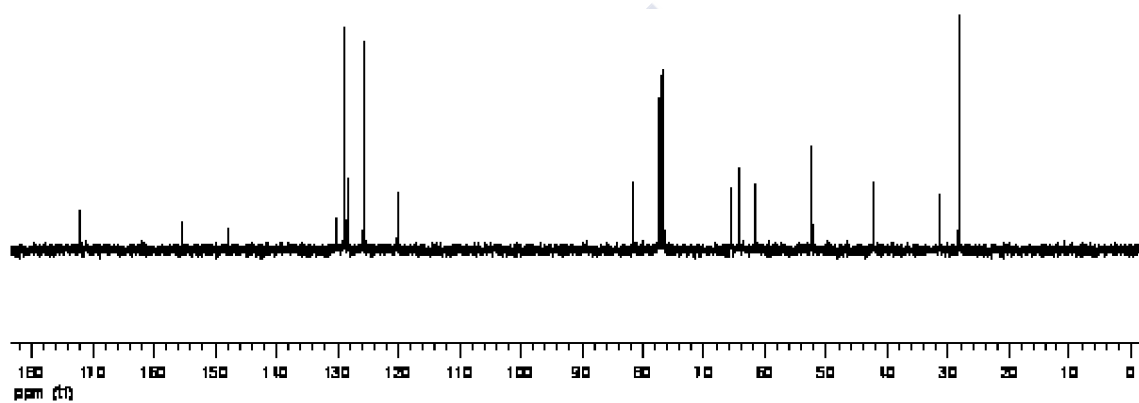
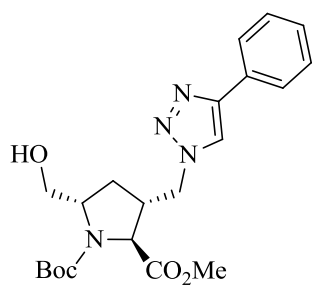
Un monocristal adecuado para análisis por difracción de rayos X, se consiguió mediante disolución de una pequeña porción del compuesto **47** en la menor cantidad posible de acetato de etilo, introducida en un vial abierto, situado en el interior de otro de mayor tamaño cerrado, y con un poco de hexano en su base, tras permanecer algunos días en un lugar fresco, oscuro y sin vibraciones.

<i>Tabla 5. Datos del cristal y refinamiento de la estructura de 47²⁶³</i>		
Fórmula empírica	$C_{21}H_{28}N_4O_5$	
Peso fórmula	416,47	
Temperatura	100,0 K	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	$P2_1/n$	
Dimensiones de la celdilla unidad	$a = 17,247 (4) \text{ \AA}$ $b = 5,5332 (10) \text{ \AA}$ $c = 22,572 (4) \text{ \AA}$	
	$\beta = 100,979 (12)^\circ$	
Volumen	$V = 2114,7 (7) \text{ \AA}^3$	
Z	4	
Densidad (calculada)	1,308 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0,10 mm ⁻¹	
F(000)	888	
Tamaño del cristal	0,8 × 0,05 × 0,02 mm ³	
Intervalo de theta para la recogida de datos	1,7 a 18,8°	
Intervalos de índices	$h = -15 \rightarrow 15, k = 0 \rightarrow 5, l = 0 \rightarrow 20$	
Reflexiones recogidas	15741	
Reflexiones independientes	1646 [R(int) = 0,131]	
Complejidad para theta = 18,84°	99,5 %	
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz entera en F ²	
Datos / restricciones / parámetros	1646 / 2 / 278	
Bondad del ajuste en F²	1,03	
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0618, wR2 = 0,1497	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,1104, wR2 = 0,1788	
Máxima diferencia de pico y agujero	0,48 y -0,36 e.Å ⁻³	

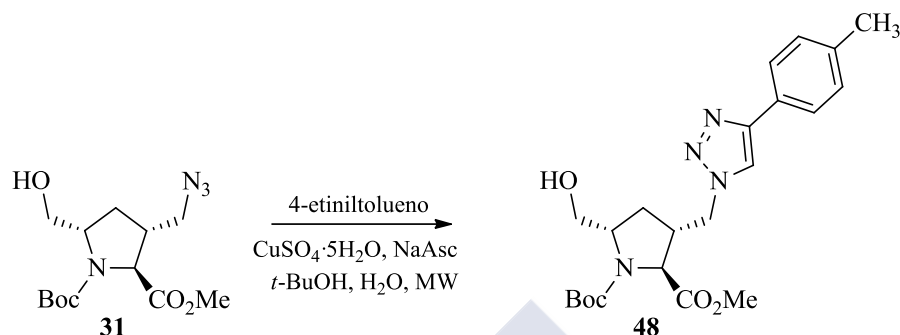
Método B. 70 °C, 100 W, 30 min. Sólido blanco, Rdto. = 92%; datos físicos y espectroscópicos idénticos a los de la muestra obtenida por el *Método A.*

²⁶³ Los datos cristalográficos del compuesto **47** han sido depositados en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge como publicación privada CCDC 928715. Copias de estos datos pueden obtenerse libres de cargo en la aplicación del CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.





3.22.7. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-{[4-(4-metilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil}pirrolidina-2-carboxilato de metilo (48)**



Método B: Arilalquino: 4-etiniltolueno. 70 °C, 100 W, 55 min. Sólido blanco, Rdto. = 76%; p.f. = 175–177 °C, después de purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (1:1).

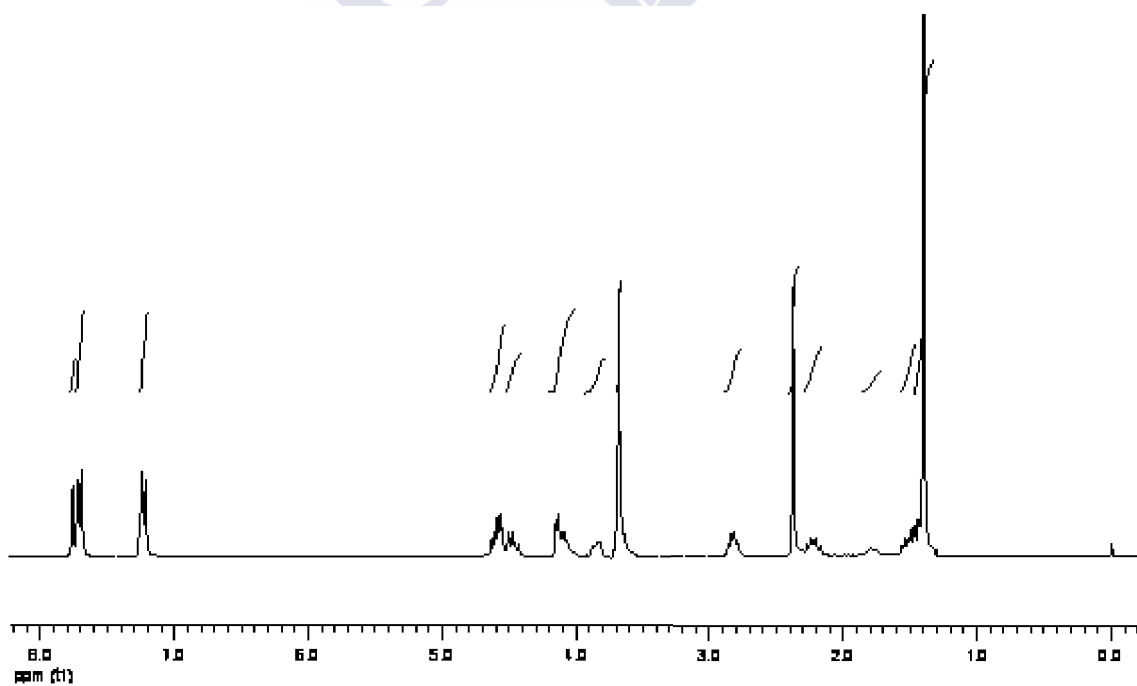
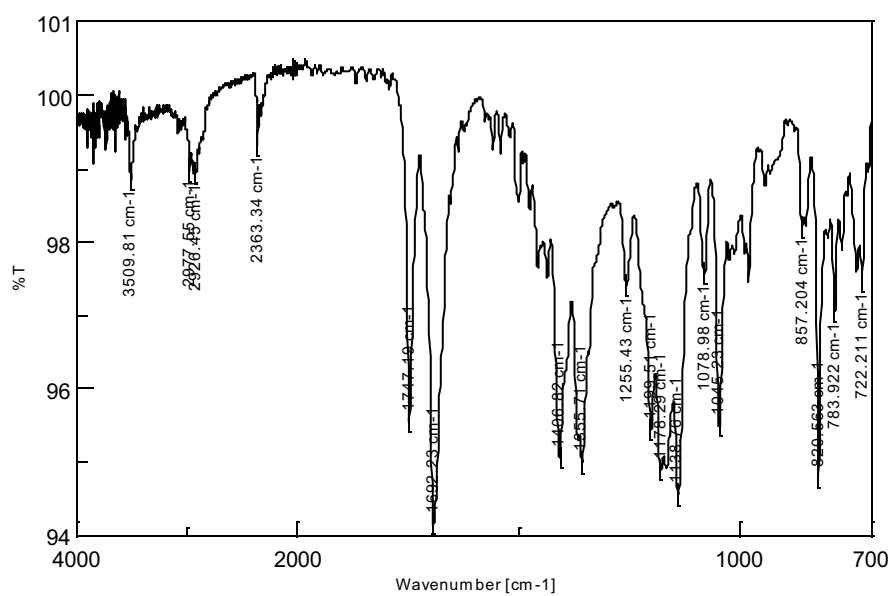
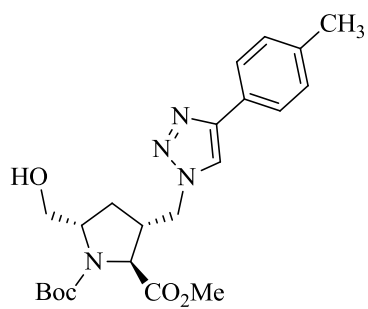
IR ν (cm⁻¹): 3510,2978, 2924, 1747, 1692, 1407, 1355, 1202, 1172, 1139, 1079, 1045, 821, 784.

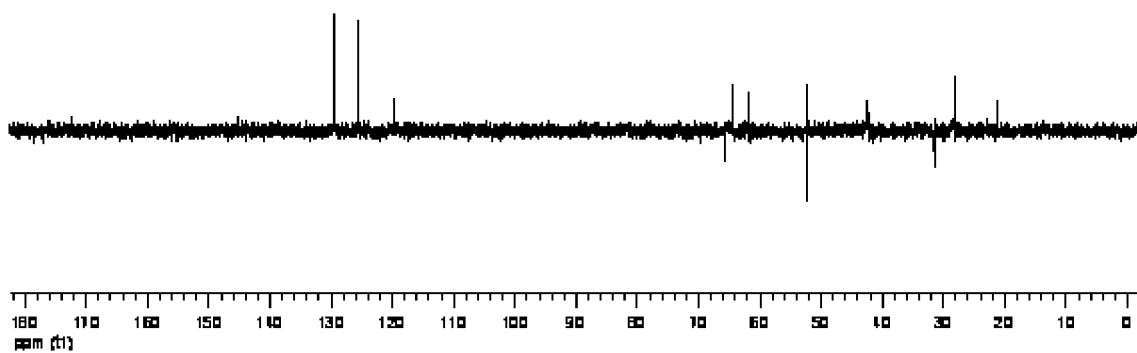
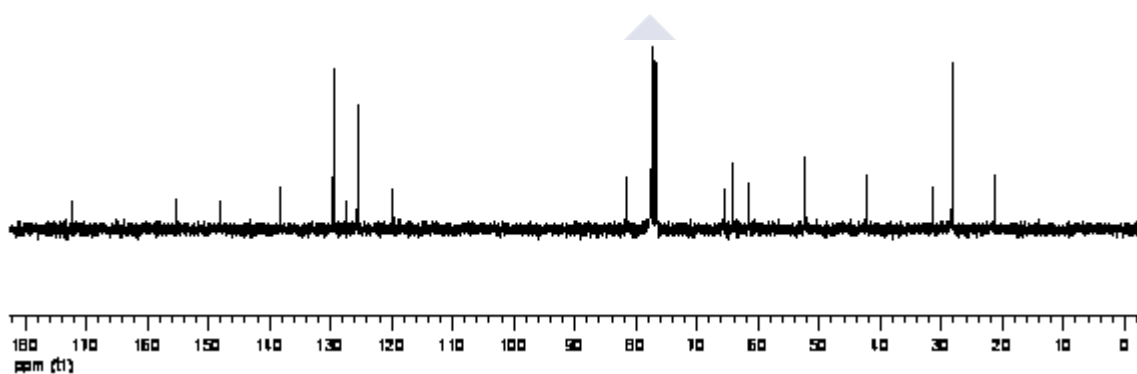
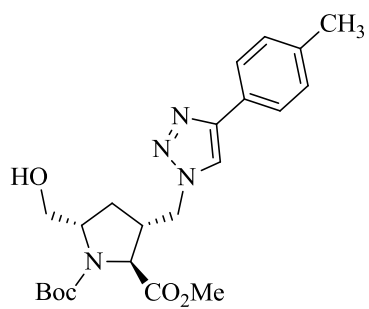
¹H RMN δ (CDCl₃) δ (ppm): 7,76 (s, 1H, 5-H_{triazolilo}), 7,71 (d, J = 7,7 Hz, 2H, 2-H y 6-H_{fenilo}), 7,24 (d, J = 7,7 Hz, 2H, 3-H y 5-H_{fenilo}), 4,60 (dd, J = 13,5, 6,7 Hz, 1H), 4,47 (dd, J = 13,9, 8,1 Hz, 1H), 4,16–4,08 (m, 2H), 3,86–3,83 (m, 1H, se simplifica al tratar con D₂O a dd centrado a 3,83, J = 12,1, 1,6 Hz, CHHOH), 3,69 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,67–3,64 (m, 1H), 2,86–2,80 (m, 1H, 3-H), 2,38 (s, 3H, CH₃), 2,27–2,17 (m, 1H, 4-HH), 1,79 (s an, 1H, intercambia con D₂O, OH), 1,57–1,45 (m, 1H, 4-HH), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,30 (C), 155,45 (C), 148,01 (C), 138,24 (C), 129,58 (2 CH), 127,44 (C), 125,62 (2 CH), 119,78 (CH), 81,71 (C), 65,63 (CH₂), 64,27 (CH), 61,68 (CH), 52,37 (CH₂), 52,28 (CH₃), 42,33 (CH), 31,50 (CH₂), 28,14 (3 CH₃), 21,27 (CH₃).

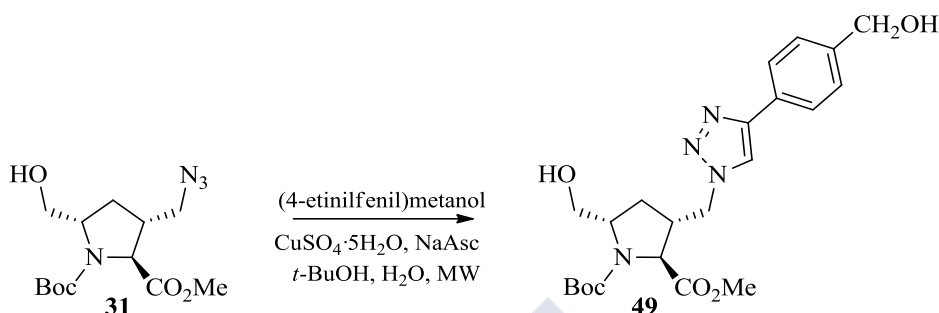
EM-IE m/z (%): 431 [(M + 1)⁺, 3], 430 (M⁺, 16), 399 (14), 357 (23), 343 (22), 330 (66), 300 (29), 299 (89), 271 (43), 173 (20), 172 (21), 171 (22), 170 (21), 160 (41), 144 (19), 140 (70), 130 (19), 126 (21), 112 (46), 105 (11), 94 (18), 82 (18), 80 (16), 57 (100).

Microanálisis. Calculado para C₂₂H₃₀N₄O₅ (430,50): C 61,38, H 7,02, N 13,01. Encontrado: C 61,96, H 7,28, N, 13,46.





3.22.8. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[[[4-(4-hidroxime-til)fenil]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (49)**



Método B: Arilalquino: (4-etinilfenil)metanol. 70 °C, 100 W, 10 min. Sólido blanco, Rdto. = 86%; p.f. = 55–57 °C, después de purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (3:1).

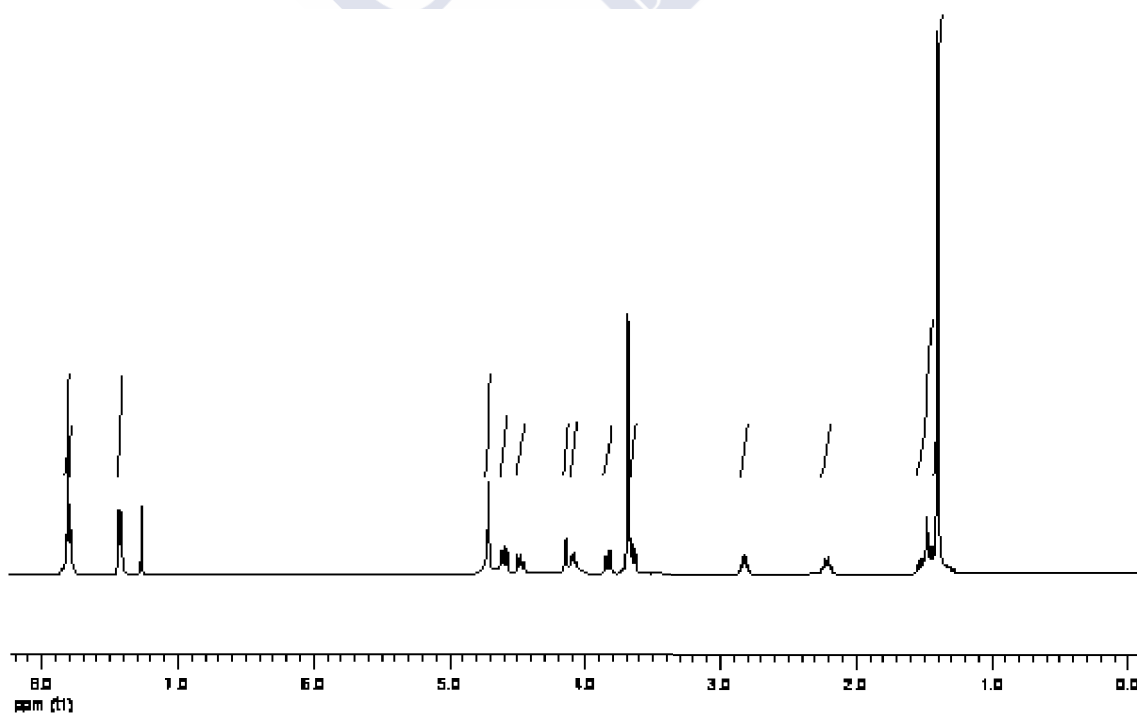
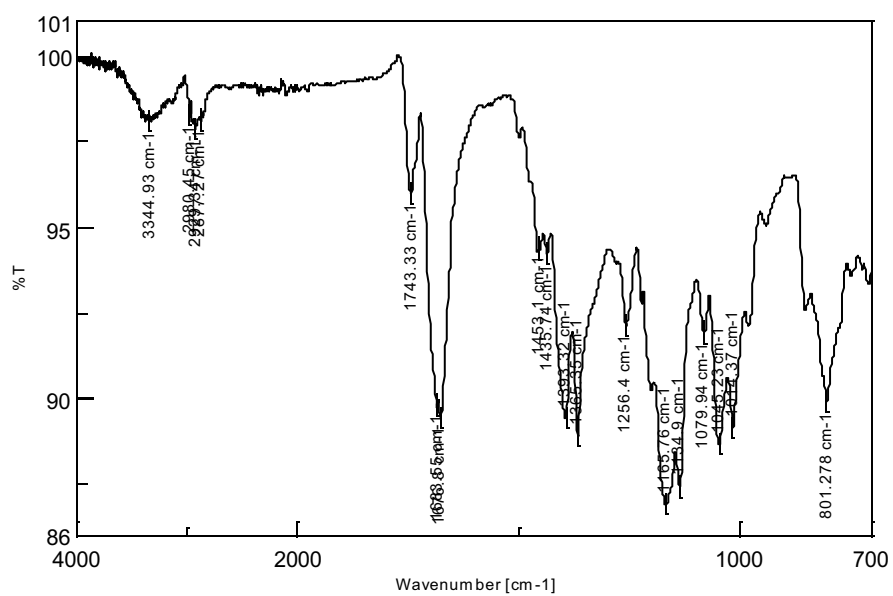
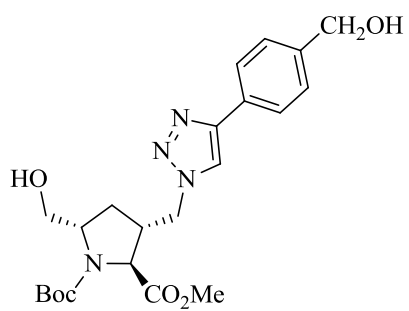
IR v (cm⁻¹): 3345,2980, 2929, 1743, 1683, 1453, 1436, 1393, 1365, 1256, 1166, 1134, 1080, 1045, 1014, 801.

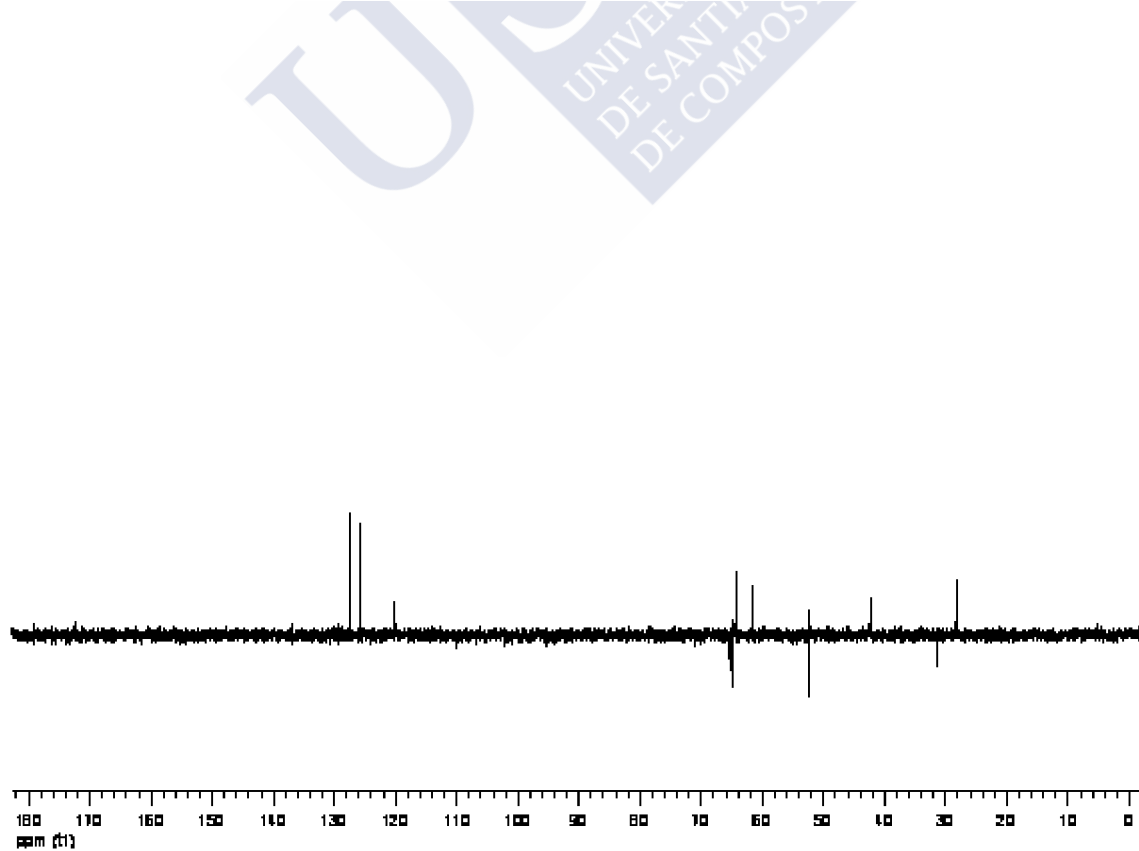
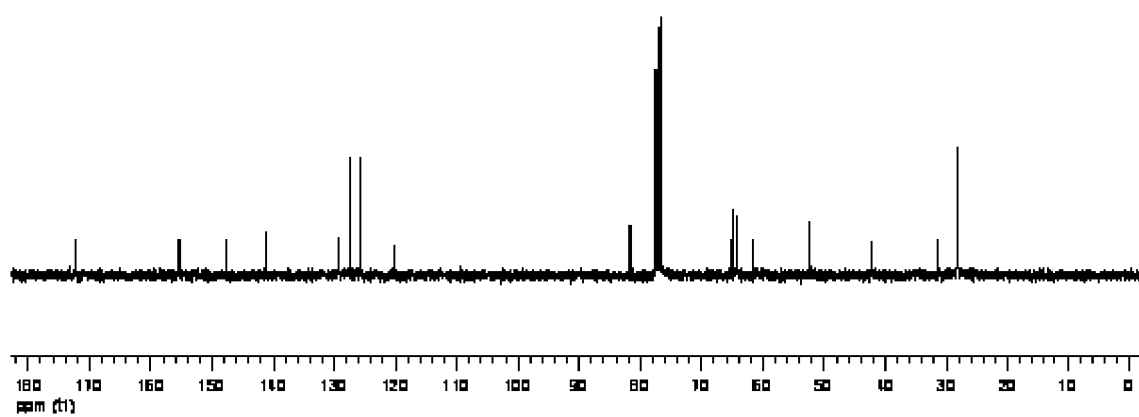
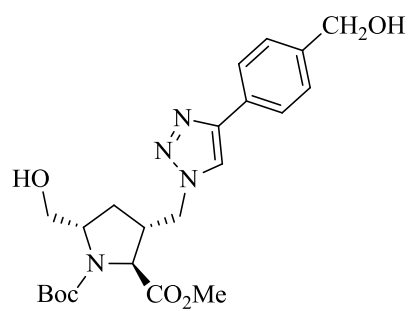
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,80(d, *J* = 8,3 Hz, 2H, 2-H y 6-H_{fenilo}), 7,81 (s, 1H, 5-H_{triazolilo}), 7,42 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, 3-H y 5-H_{fenilo}), 4,71 (s, 2H, CH₂OH), 4,60 (dd, *J* = 13,7, 6,8 Hz, 1H), 4,47 (dd, *J* = 13,7, 8,3Hz, 1H), 4,15-4,14 (m, 1H), 4,10-4,07 (m, 1H), 3,83 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 3,69 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,65 (dd, *J* = 11,7, 5,9 Hz, 1H), 2,85-2,80 (m, 1H, 4-HH), 2,25-2,18 (m, 1H, 4-HH), 1,55-1,44 (m, 3H, dos de ellos intercambian con D₂O, 2 OH), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,33 (C), 155,41 (C), 147,64 (C), 141,30 (C), 129,39 (C), 127,49 (2 CH), 125,82 (2 CH), 120,28 (CH), 81,73 (C), 65,31 (CH₂), 64,76 (CH₂), 64,27 (CH), 61,51 (CH), 52,40 (CH₂), 52,34 (CH₃), 42,30 (CH), 31,34 (CH₂), 28,14 (3 CH₃).

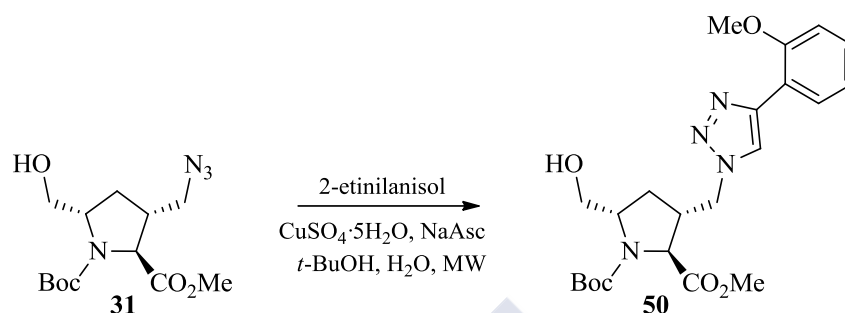
EM-IE *m/z* (%): 446 (M⁺, 5), 346 (53), 373 (13), 359 (15), 346 (53), 315 (80), 287 (37), 259 (10), 189 (18), 176 (32), 172 (13), 171 (27), 170 (20), 158 (24), 140 (100), 138 (15), 130 (17), 126 (21), 112 (60), 103 (12), 94 (21), 82 (26), 80 (27), 57 (80).

Microanálisis. Calculado para C₂₂H₃₀N₄O₆ (446,50): C 59,18, H 6,77, N 12,55. Encontrado: C 59,46, H 6,54, N, 12,79.





3.22.9. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[[4-(2-metoxifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (50)**



Método B. Arilalquino: 2-etinilanol. 90 °C, 100 W, 60 min. Aceite pardo, Rdto. = 73%, después de purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (1:1).

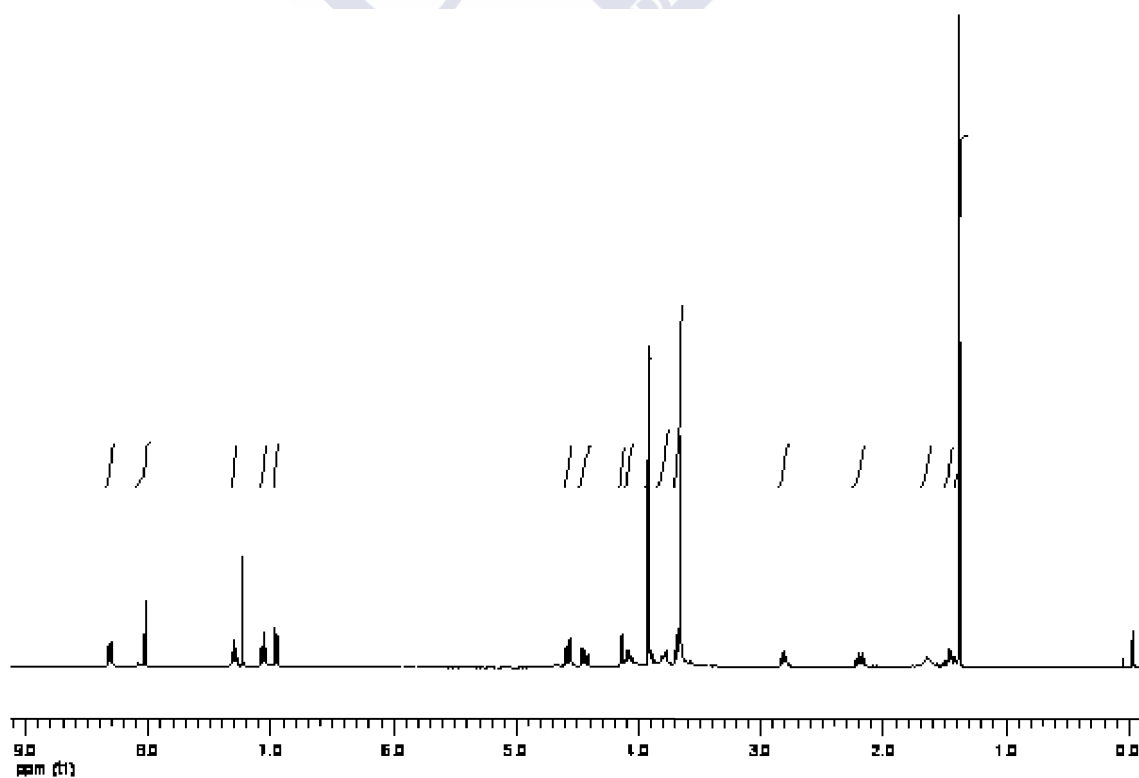
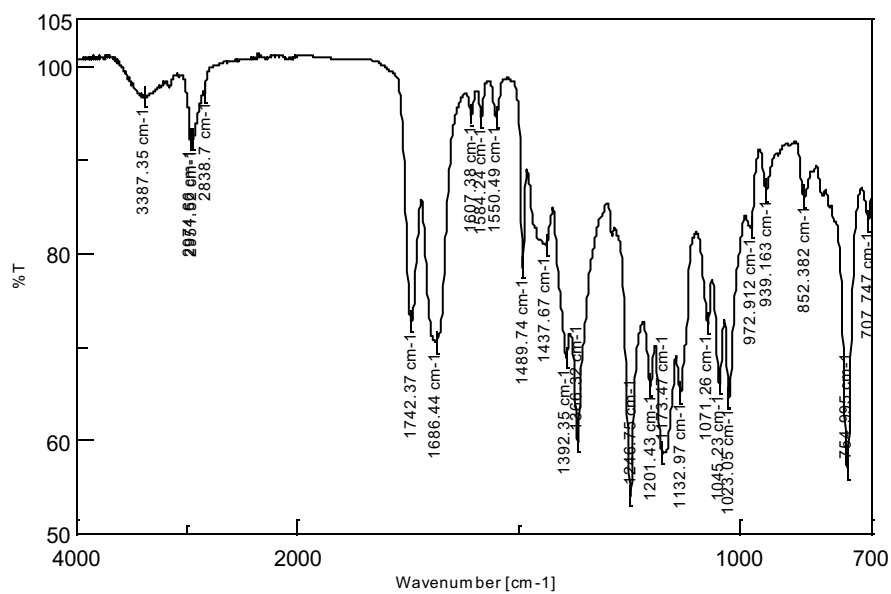
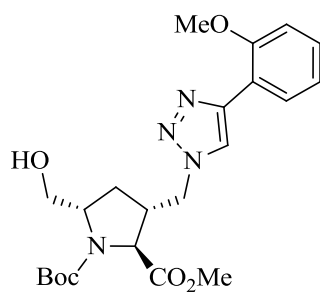
IR v (cm⁻¹): 3387, 2954, 1742, 1686, 1490, 1438, 1392, 1366, 1247, 1173, 1133, 1045, 1023, 755.

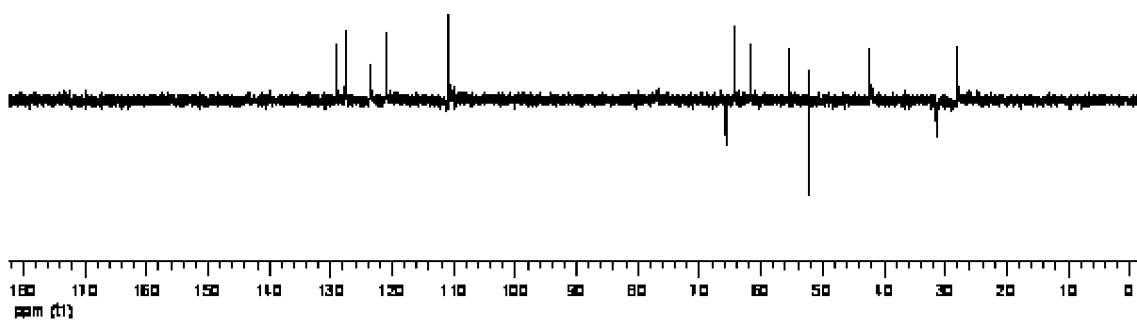
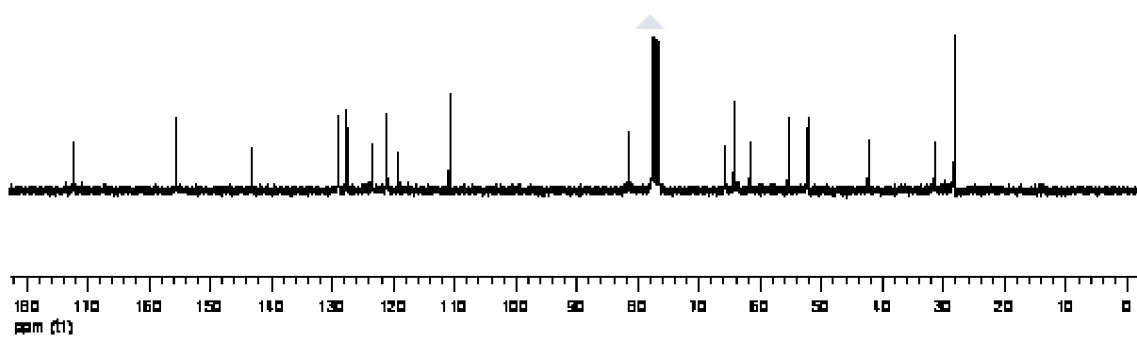
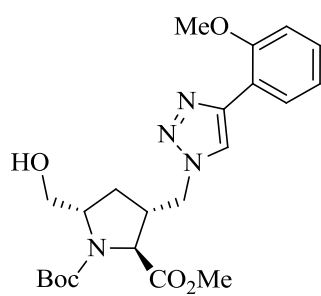
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,31 (dd, *J* = 7,3, 1,5 Hz, 1H, 6-H_{fenilo}), 8,03 (s, 1H, 5-H_{triazolilo}), 7,32-7,28 (m, 1H, 4-H_{fenilo}), 7,08-7,04 (m, 1H, 5-H_{fenilo}), 6,96 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, 3-H_{fenilo}), 4,57 y 4,44 (parte AB de un sistema ABM, *J* = 13,6, 8,3, 6,8 Hz, 2H), 4,14 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 4,12-4,06 (m, 1H), 3,93 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,82-3,78 (m, 1H), 3,71-3,64 (m, 1H), 3,66 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,84-2,79 (m, 1H), 2,23-2,16 (m, 1H, 4-HH), 1,65 (s an, 1H, intercambia con D₂O, OH), 1,50-1,43 (m, 1H, 4-HH), 1,38 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,36 (C), 155,65 (C), 155,53 (C), 143,28 (C), 129,09 (CH), 127,61 (CH), 123,51 (CH), 121,08 (CH), 119,09 (C), 110,85 (CH), 81,67 (C), 65,74 (CH₂), 64,30 (CH), 61,68 (CH), 55,38 (CH₃), 52,29 (CH₂), 52,17 (CH₃), 42,33 (CH), 31,51 (CH₂), 28,12 (3 CH₃).

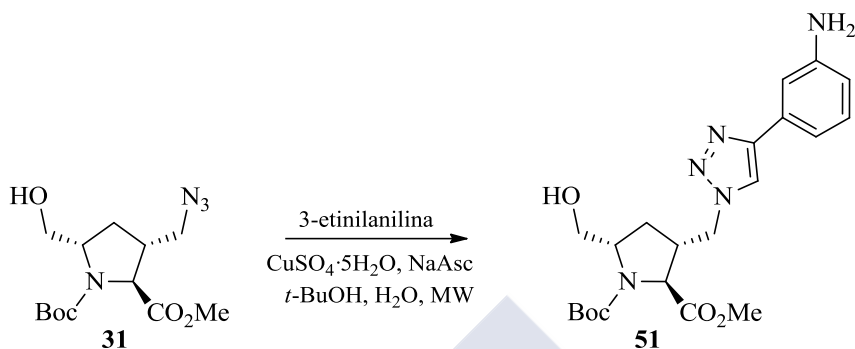
EM-IE *m/z* (%): 448 [(*M* + 2)⁺, 25], 447 [(*M* + 1)⁺, 77], 446 (*M*⁺, 80), 416 (43), 415 (41), 392 (13), 391 (47), 373 (49), 359 (26), 347 (26), 346 (79), 315 (95), 287 (56), 259 (28), 189 (45), 176 (63), 172 (33), 170 (30), 140 (45), 112 (45), 94 (18), 82 (25), 80 (25), 57 (100).

EM-AR *m/z*: calculado para C₂₂H₃₀N₄O₆, 446,2165; encontrado, 446,2183.





3.22.10. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3-[[4-(3-Aminofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil]-1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (51)**



Método B. Arilalquino: 3-etinilanilina. 90 °C, 100 W, 45 min. Sólido pardo, Rdto. = 84%; p.f. = 68–70 °C tras purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (1:1).

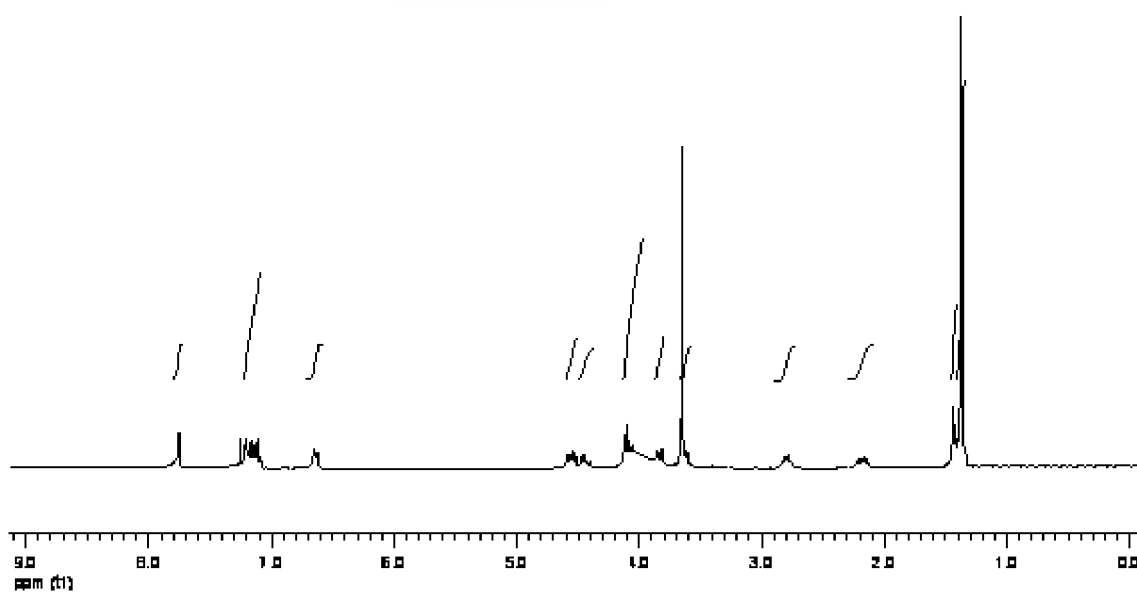
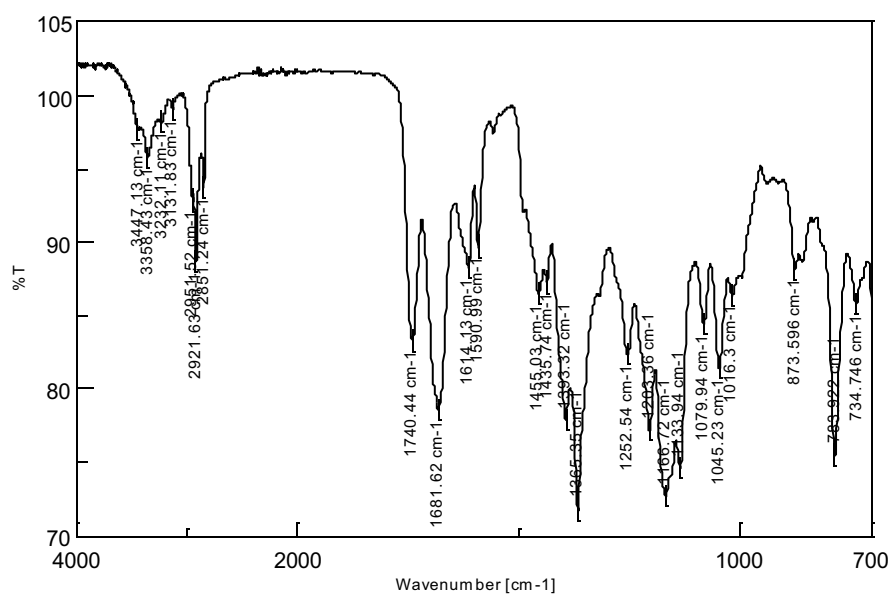
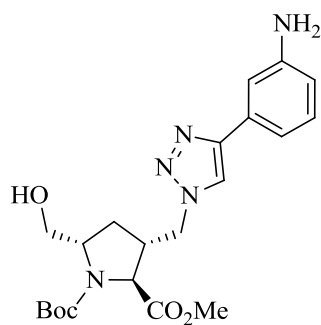
IR v (cm⁻¹): 3447, 3358, 2922, 1740, 1682, 1614, 1590, 1455, 1365, 1252, 1167, 1134, 1045, 874, 784, 735.

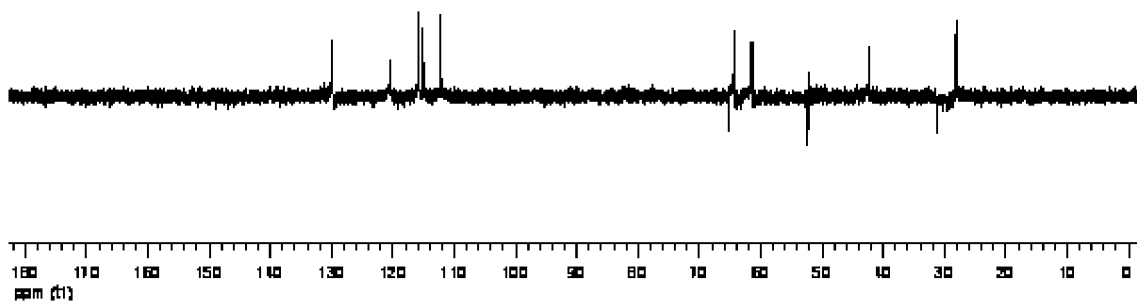
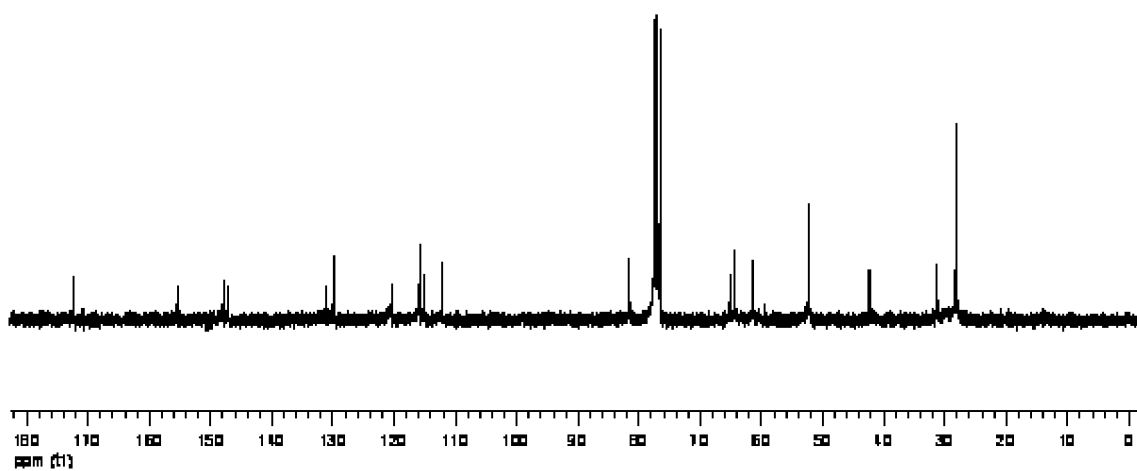
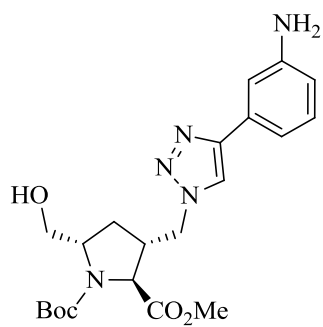
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,75 (s, 1H, 5-H_{triazolilo}), 7,21-7,09 (m, 3H, 2-H, 5-H y 6-H H_{fenilo}), 6,64 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, 4-H H_{fenilo}), 4,56 (dd, *J* = 13,6, 7,0 Hz, 1H), 4,43 (dd, 1H, *J* = 13,6, 8,1 Hz), 4,12-4,01 (m, 4H, dos de ellos intercambian con D₂O, NH₂), 3,89-3,82 (m, 1H), 3,76-3,67 (m, 1H), 3,65 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,63-3,56 (m, 1H), 2,83-2,76 (m, 1H), 2,23-2,13 (m, 1H, 4-HH), 1,58-1,42 (m, 2H, uno de ellos intercambia con D₂O, OH y 4-HH), 1,37 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,36 (C), 155,36 (C), 147,93 (C), 147,05 (C), 131,15 (C), 129,81 (CH), 120,39 (CH), 115,91 (CH), 115,11 (CH), 112,20 (CH), 81,61 (C), 65,17 (CH₂), 64,29 (CH), 61,46 (CH), 52,32 (CH₂), 52,27 (CH₃), 42,33 (CH), 31,24 (CH₂), 28,12 (3 CH₃).

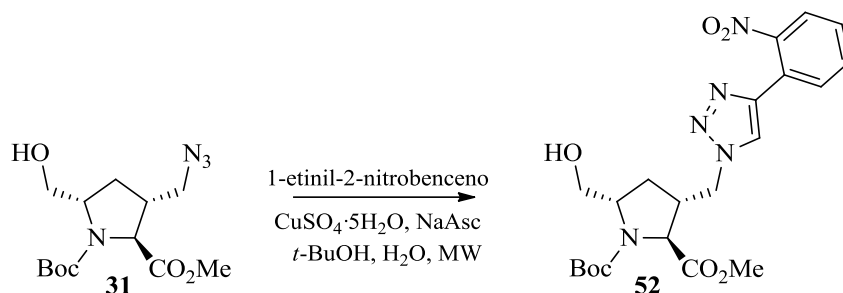
EM-IE *m/z* (%): 431 (M⁺, 47), 400 (9), 358 (27), 298 (85), 272 (47), 244 (21), 183 (17), 174 (38), 171 (30), 161 (57), 158 (25), 140 (100), 131 (38), 130 (38), 126 (27), 117 (54), 112 (74), 94 (26), 82 (37), 80 (36), 57 (97).

Microanálisis. Calculado para C₂₁H₂₉N₅O₅ (431,49): C 58,45, H 6,77, N 16,23. Encontrado: C 58,92, H 7,01, N, 16,46.





3.22.11. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[[4-(2-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (52)**



Método B. Arilalquino: 1-etinil-2-nitrobenceno. 70 °C, 100 W, 160 min. Sólido anaranjado, Rdto. = 38%, bajo punto de fusión, después de purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (1:1).

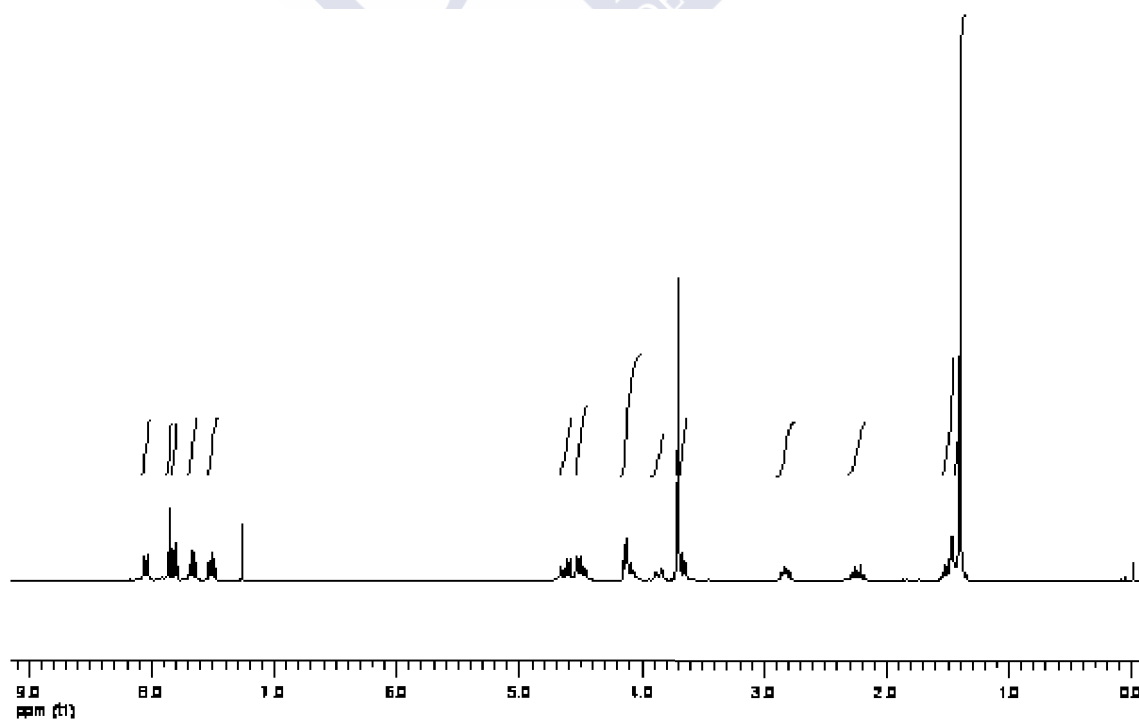
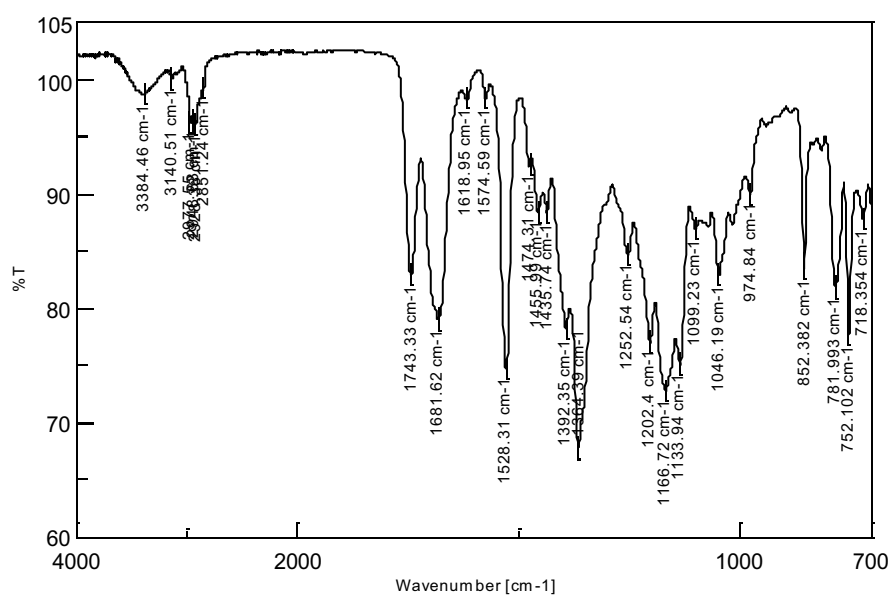
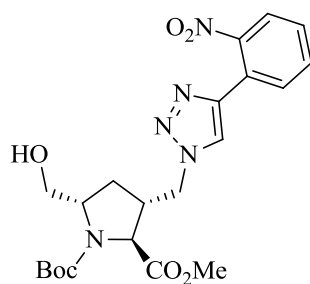
IR v (cm⁻¹): 3384, 2978, 2926, 1743, 1682, 1528, 1456, 1392, 1364, 1252, 1166, 1134, 1046, 852, 781, 752.

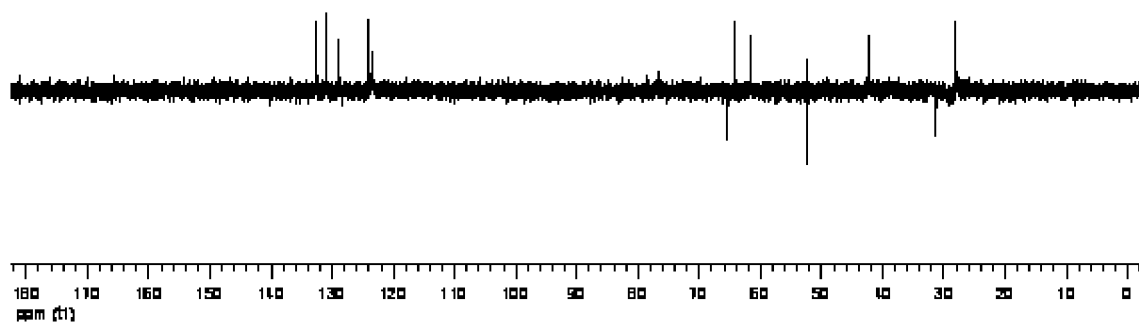
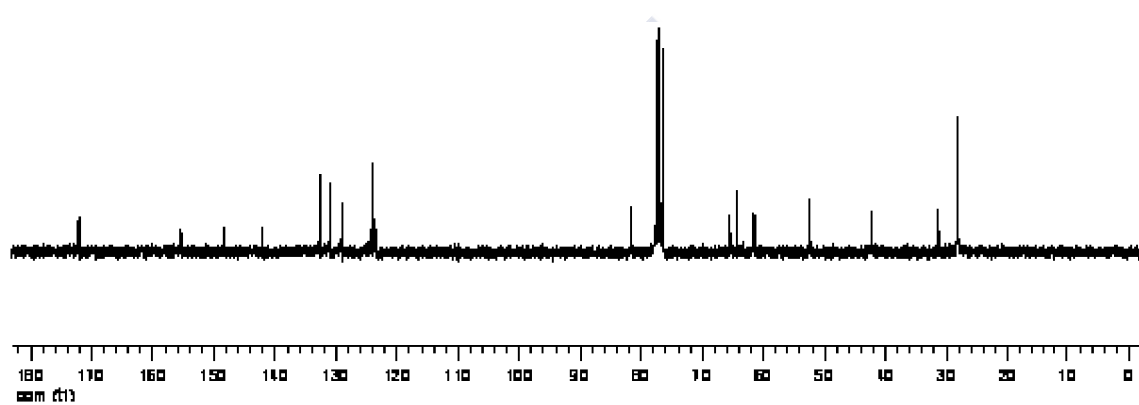
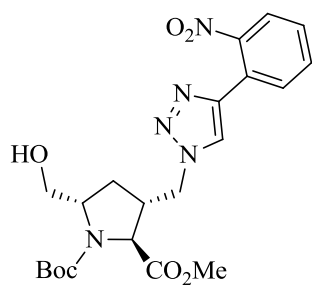
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,06-8,03 (m, 1H, 6-H_{fenilo}), 7,85 (s, 1H, 5-H_{triazolilo}), 7,81 (dd, *J* = 7,8, 1,1 Hz, 1H, 3-H_{fenilo}), 7,69-7,64 (m, 1H, 5-H_{fenilo}), 7,53-7,47 (m, 1H, 4-H_{fenilo}), 4,62 (dd, *J* = 13,8, 6,9 Hz, 1H), 4,50 (dd, *J* = 13,9, 8,1 Hz, 1H, 2-H), 4,14-4,07 (m, 2H), 3,86 (d, *J* = 12,1 Hz, 1H, CHH), 3,70 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,66 (dd, *J* = 12,0, 5,9 Hz, 1H, CHH), 2,84 y 2,80 (parte AB de un sistema ABM, *J* = 13,0, 7,2 Hz, 1H, CHHOH), 2,23 (dt, *J* = 13,5, 7,7 Hz, 1H, 4-HH), 1,61-1,24 (m, 2H, uno de ellos intercambia con D₂O, 4-HH y OH), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,16 (C), 155,44 (C), 148,28 (C), 142,06 (C), 132,54 (CH), 131,03 (CH), 129,07 (CH), 124,40 (C), 124,01 (CH), 123,58 (CH), 81,70 (C), 65,49 (CH₂), 64,21 (CH), 61,52 (CH), 52,48 (CH₂), 52,36 (CH₃), 42,21 (CH), 31,34 (CH₂), 28,12 (3 CH₃).

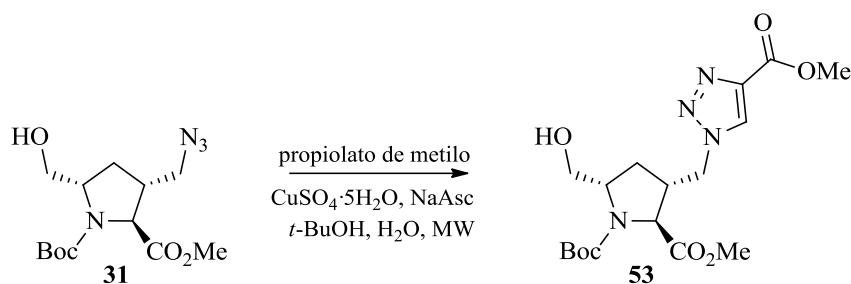
EM-IE *m/z* (%): 430 [(M⁺ - OCH₃), 12], 388 [(M⁺ - *t*-Bu), 17], 329 [(M⁺ - (Boc + OCH₃), 100], 180 (20), 170 (23), 158 (11), 140 (35), 126 (14), 112 (51), 94 (16), 82 (23), 80 (40), 57 (93).

Microanálisis. Calculado para C₂₁H₂₇N₅O₇ (461,47): C 54,66, H 5,90, N 15,18. Encontrado: C 54,97, H 6,17, N, 15,46.





3.22.12. (\pm)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)-3-[(4-metoxicarbonil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (53)**



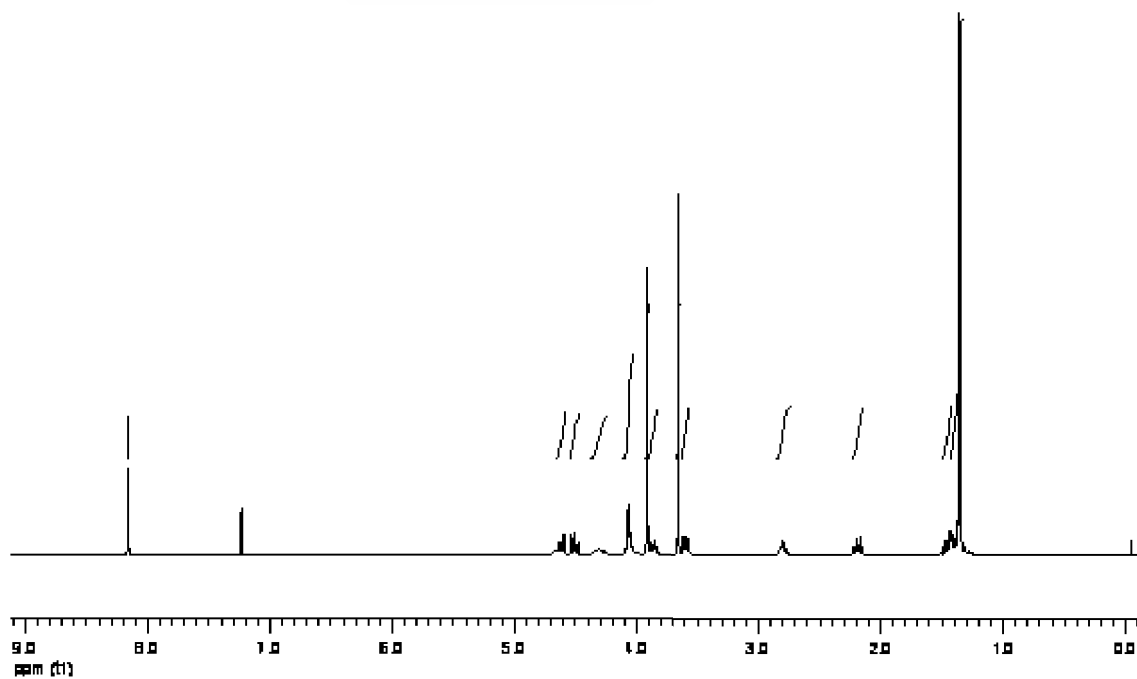
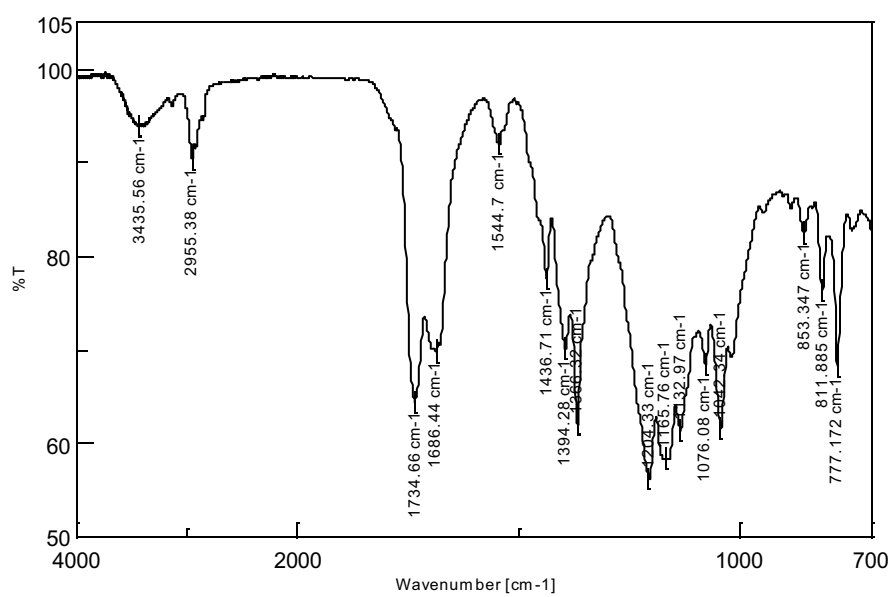
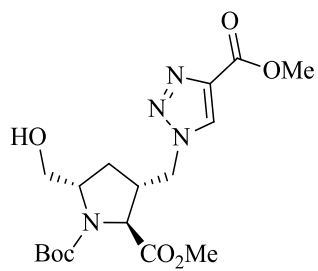
Método B. Alquino: propiolato de metilo. 70 °C, 100 W, 15 min. Aceite amarillo claro, Rdto. = 94%, después de purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (1:1).

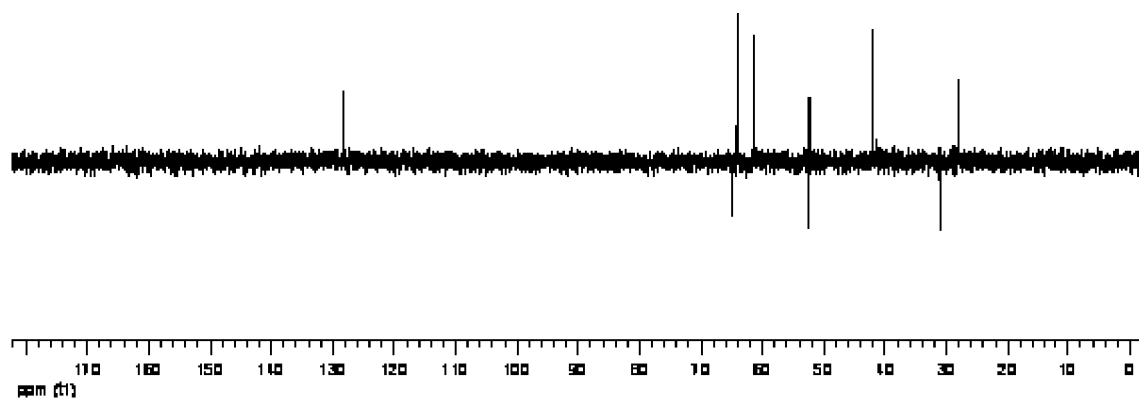
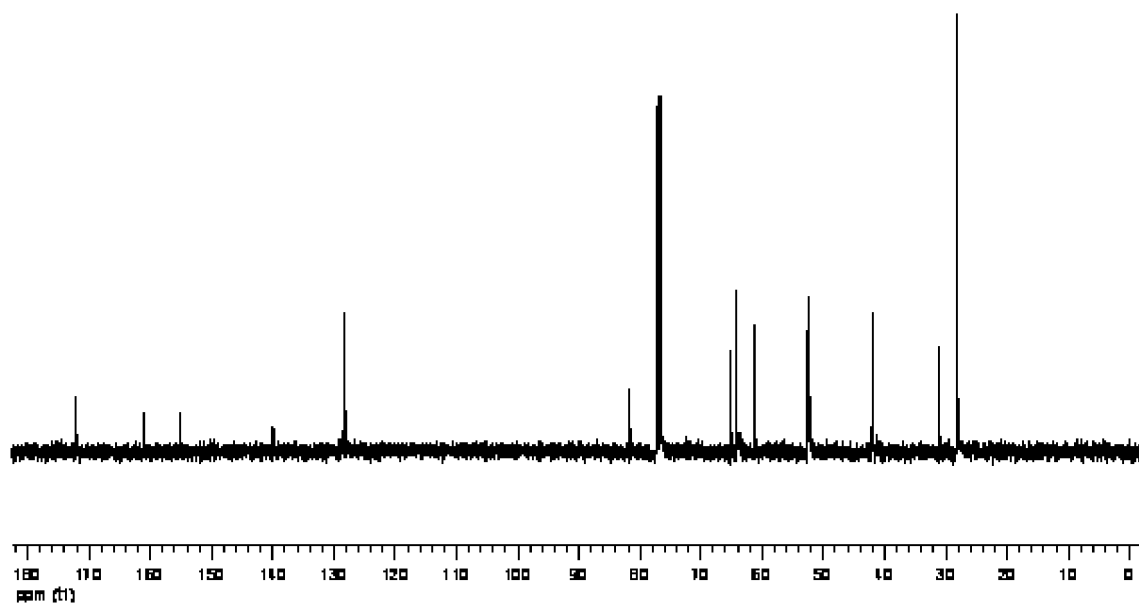
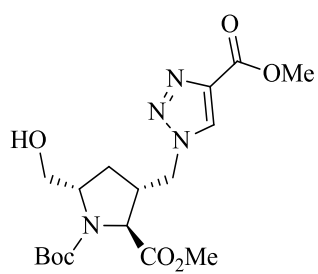
IR ν (cm⁻¹): 3436,2955, 1737, 1686, 1545,1436, 1394, 1367, 1204, 1166, 1133, 1042, 777.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,16 (s, 1H, 5-H_{triazol}), 4,62 (dd, J = 13,7, 6,8 Hz, 1H), 4,51 (dd, J = 13,7, 8,3 Hz, 1H), 4,32 (s an, 1H, intercambia con D₂O, OH), 4,10-4,04 (m, 2H), 3,92 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,86 (d, J = 11,7 Hz, 1H), 3,66 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,60 (dd, J = 11,7, 5,8 Hz, 1H), 2,80 (m, 1H), 2,18 (dt, J = 13,2, 7,8 Hz, 1H, 4-HH), 1,49-1,42 (m, 1H, 4-HH), 1,36 (s, 9H, 3 CH₃).

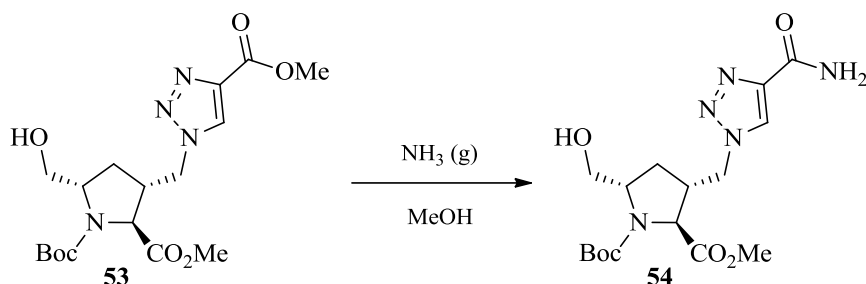
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,04 (C), 160,98 (C), 155,25 (C), 139,96 (C), 128,19 (CH), 81,72 (C), 65,06 (CH₂), 64,10 (CH), 61,28 (CH), 52,57 (CH₂), 52,39 (CH₃), 52,27 (CH₃), 42,07 (CH), 31,04 (CH₂), 28,09 (3 CH₃).

EM-IE m/z (%): 368 [(M+1)⁺ - CH₂OH, 2], 267 (4), 253 (4), 169 (12), 155 (15), 141 (16), 127 (21), 125 (19), 123 (11), 113 (23), 112 (11), 109 (15), 99 (30), 97 (40), 85 (62), 81 (20), 71 (77), 70 (21), 57 (100).





3.23. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3-[(4-Aminocarbonil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil]-1-(*terc*-butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**54**)**



Sobre una disolución de **53** (60 mg, 0,15 mmol) en MeOH (10 mL) enfrida mediante un baño de hielo, se hizo pasar una corriente de NH₃ hasta saturación del sistema. La disolución resultante se mantuvo en agitación durante 6 h y tras concentrar el metanol a sequedad el NH₃ residual se eliminó por coevaporación a vacío con CH₂Cl₂, rindiendo **54** (50 mg, 87%) como un sólido beige, p.f. = 79–81 °C.

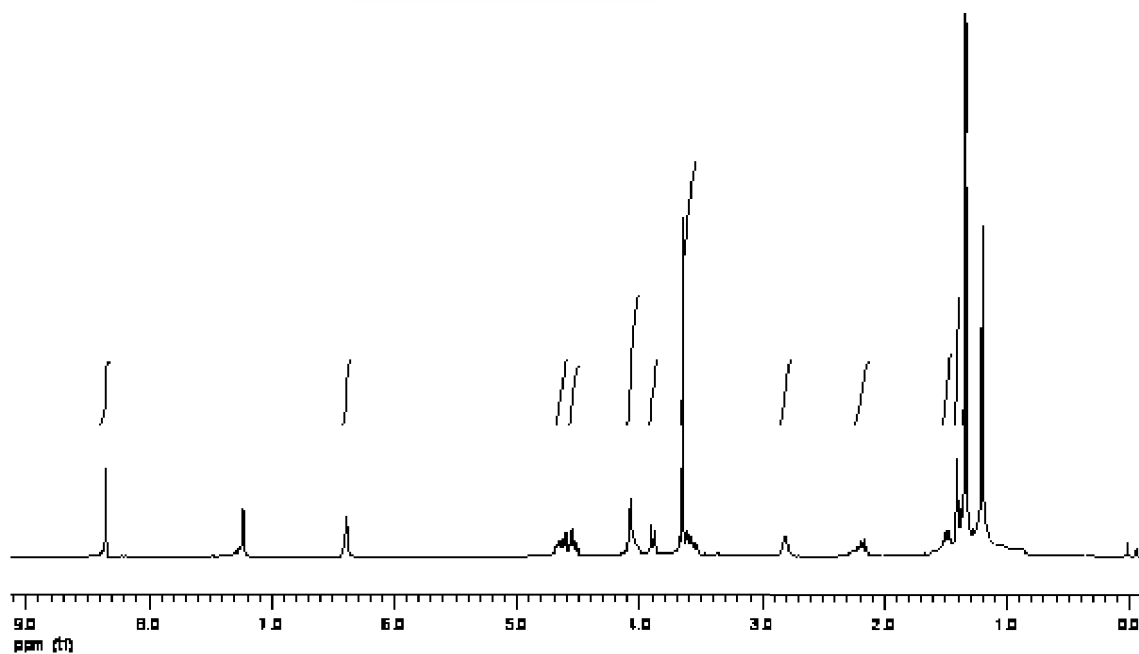
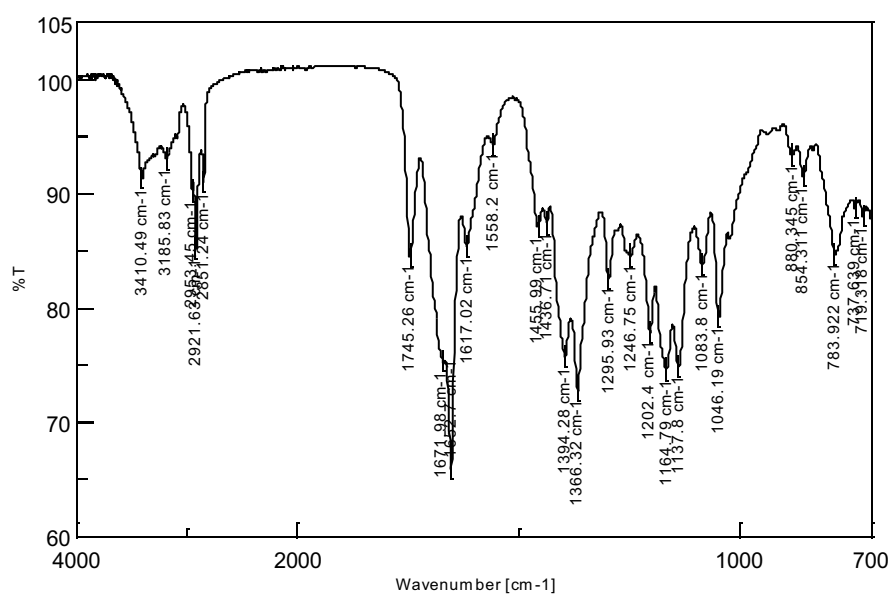
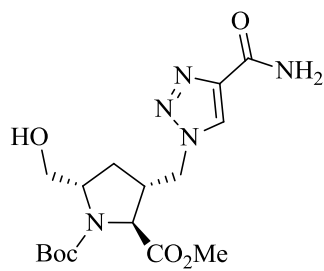
IR v (cm⁻¹): 3410, 3185, 2922, 1745, 1672, 1653, 1617, 1394, 1366, 1295, 1202, 1165, 1138, 1046, 784.

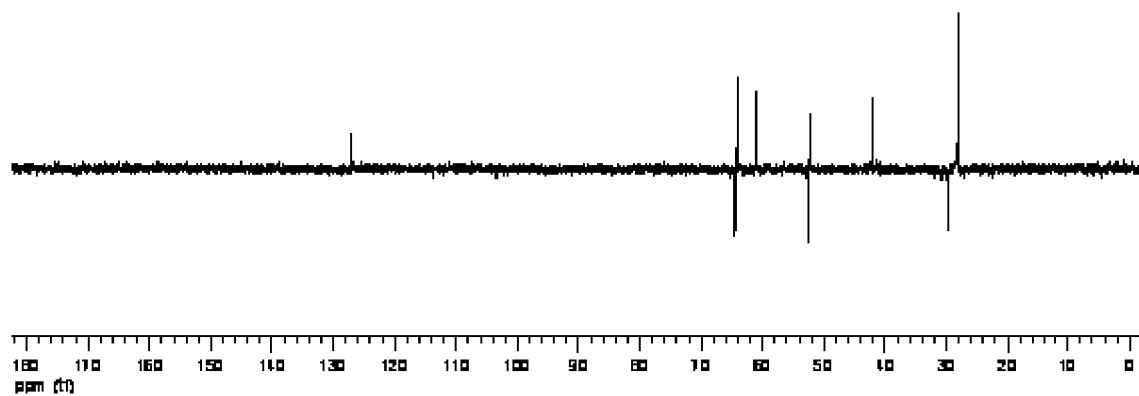
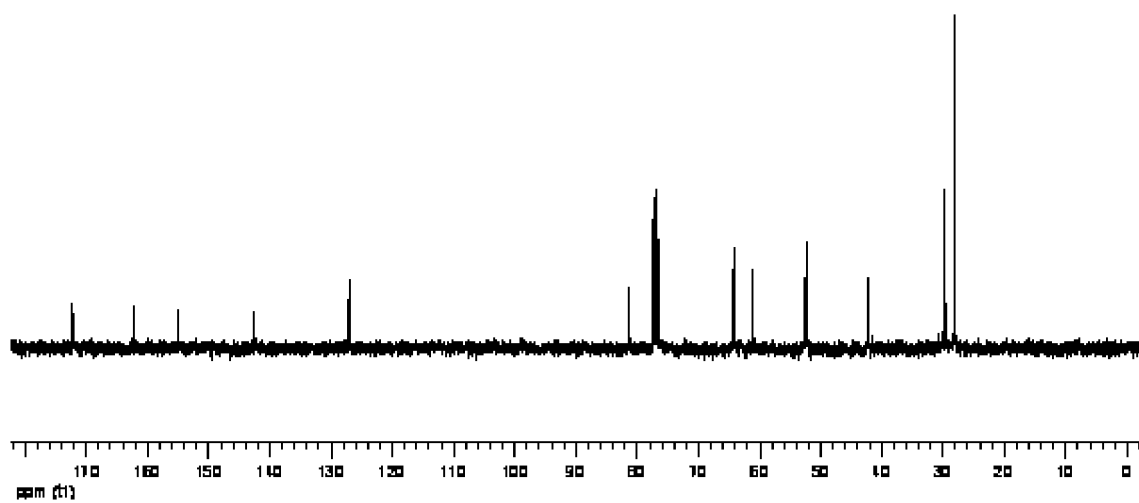
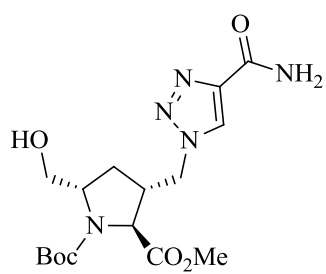
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,35 (s, 1H, 5-H_{triazol}), 6,39 (s, 2H, intercambian con D₂O, NH₂), 4,68-4,60 (m, 1H), 4,56-4,51 (m, 1H), 4,08-4,02 (m, 2H), 3,89 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 3,68-3,54 (m, 1H), 3,65 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,85-2,80 (m, 1H), 2,27-2,14 (m, 1H, 4-HH), 1,52-1,46 (m, 1H), 1,41 (s, 2H, uno de ellos intercambia con D₂O, OH y 4-HH), 1,34 (s, 6H, 2 CH₃), 1,20 (s, 3H, CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,22 (C), 162,36 (C), 155,15 (C), 142,53 (C), 127,06 (CH), 81,50 (C), 64,50 (CH₂), 64,13 (CH), 61,10 (CH), 52,62 (CH₂), 52,35 (CH₃), 42,16 (CH), 29,63 (CH₂), 28,27 y 28,09 (3 CH₃).

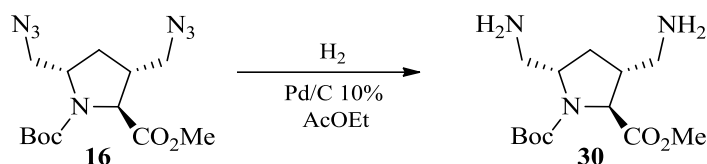
EM-IE *m/z* (%): 352 [(M⁺ – CH₂OH), 15], 310 (13), 297 (24), 283 (41), 267 (20), 253 (59), 252 (88), 224 (39), 207 (27), 179 (29), 171 (26), 170 (22), 158 (31), 141 (38), 140 (92), 138 (30), 136 (25), 113 (28), 112 (100), 108 (36), 94 (34), 82 (54), 81 (25), 80 (78), 57 (96).

Microanálisis. Calculado para C₁₆H₂₅N₅O₆ (383,40): C 50,12, H 6,57, N 18,27. Encontrado: C 50,45, H 6,79, N, 18,56.





3.24. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-Bis(aminometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**30**)**



Una suspensión de **16** (300 mg, 0,84 mmol) y Pd/C 10% (20 mg, 0,28 mmol) en AcOEt seco (14 mL), se agitó bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 18 h, transcurridas las cuales el catalizador se eliminó por filtración sobre celita y se lavó con AcOEt (15 mL). La eliminación del disolvente del líquido filtrado a vacío, condujo a **30** (240 mg, 96%) como un aceite incoloro.

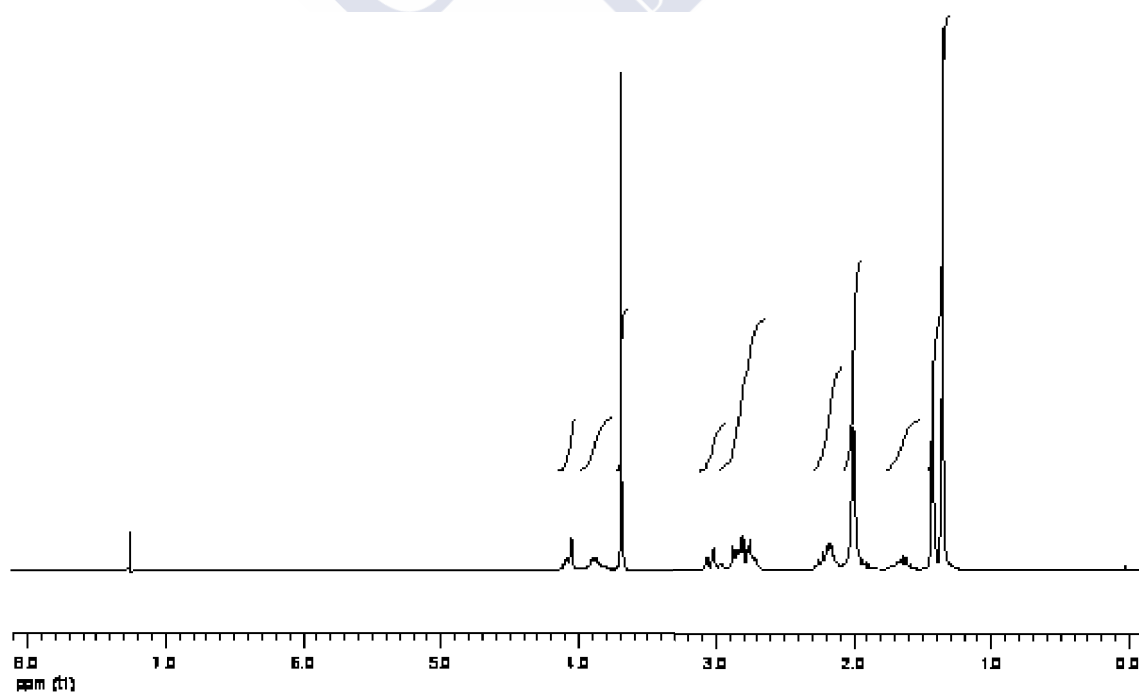
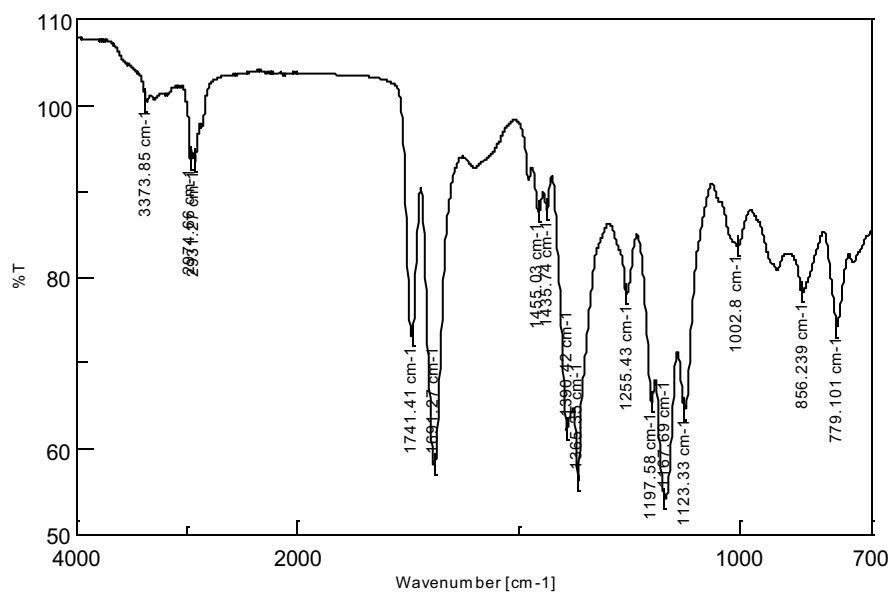
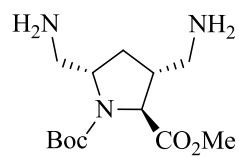
IR v (cm⁻¹): 2931, 1741, 1691, 1455, 1436, 1390, 1365, 1255, 1198, 1168, 1123, 856, 779.

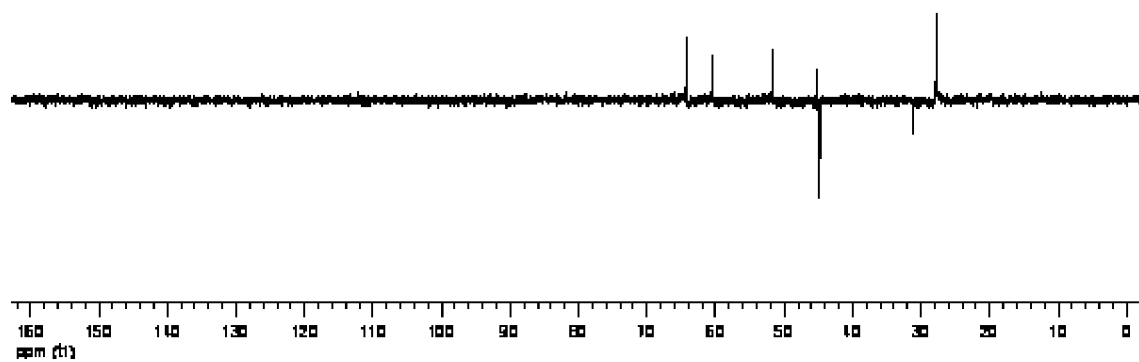
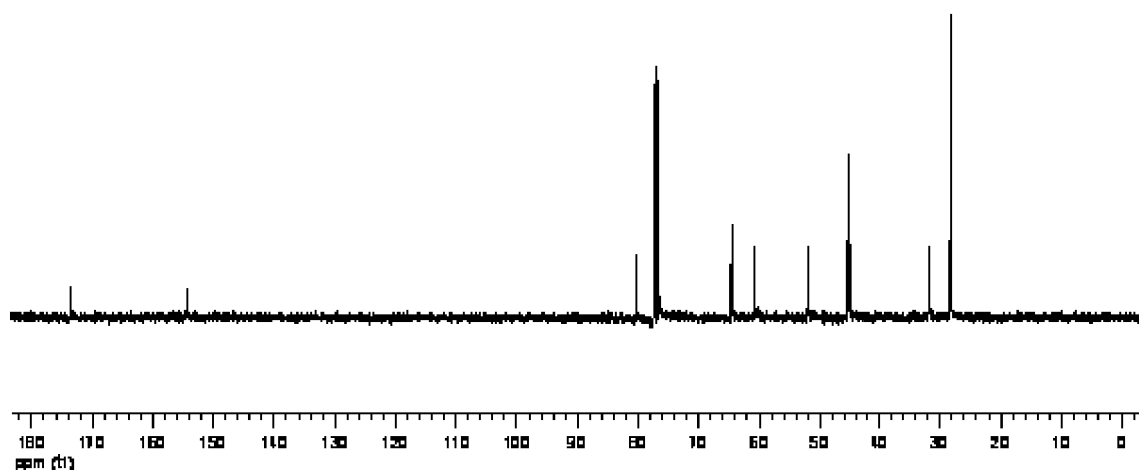
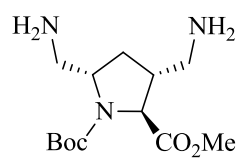
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,11-4,05 (m, 1H), 3,91-3,85 (m, 1H), 3,69 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,04 (dd, *J* = 12,7, 3,9 Hz, 1H), 2,88-2,71 (m, 3H), 2,25-2,12 (m, 2H), 2,02 (s an, 4H, intercambian con D₂O, 2 NH₂), 1,68-1,62 (m, 1H), 1,41 (s, 3H, CH₃), 1,35 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,58 (C), 154,40 (C), 80,34 (C), 64,42 (CH), 60,76 (CH), 51,97 (CH₃), 45,50 (CH₂), 45,41 (CH₂), 45,10 (CH), 31,68 (CH₂), 28,40 (3 CH₃).

EM-IQ *m/z* (%): 289 (8), 288 [(M + 1)⁺, 49], 216 (42), 214 (39), 213 (37), 190 (61), 188 (96), 173 (18), 172 (97), 170 (54), 156 (94), 155 (33), 142 (20), 141 (21), 140 (86), 128 (21), 126 (23), 125 (41), 111 (30), 109 (21), 108 (27), 99 (54), 97 (22), 96 (23), 94 (21), 85 (25), 84 (24), 83 (29), 82 (87), 81 (27), 80 (60), 71 (37), 70 (26), 69 (45), 68 (74), 67 (29), 61 (31), 59 (30), 58 (44), 57 (98), 56 (100), 55 (85).

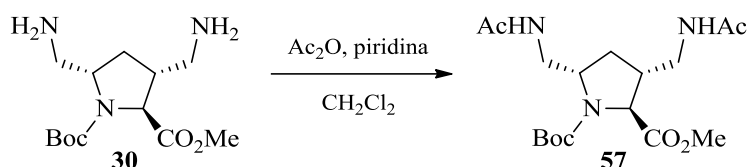
EM-AR *m/z*: calculado para C₁₃H₂₆N₃O₄, 288,1923; encontrado, 288,1932 [MH]⁺.





3.25. (±)-(2*R**,3*S**,5*R**)-3,5-Bis(acetamidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**57**)

3.25.1. Método A



Una disolución de **30** (50 mg, 0,18 mmol), Ac₂O (0,102 mL, 1,08 mmol) y piridina (0,10 mL, 1,08 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 6 h; tras las cuales se añadió H₂O (20 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a sequedad, rindiendo un residuo sólido (42 mg) que se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna, empleando como soporte gel de sílice y como eluyente CH₂Cl₂/MeOH (30:1). De las fracciones que contenían producto, se aisló **57** (30 mg, 46%) como un sólido blanco, p.f. = 188–190 °C.

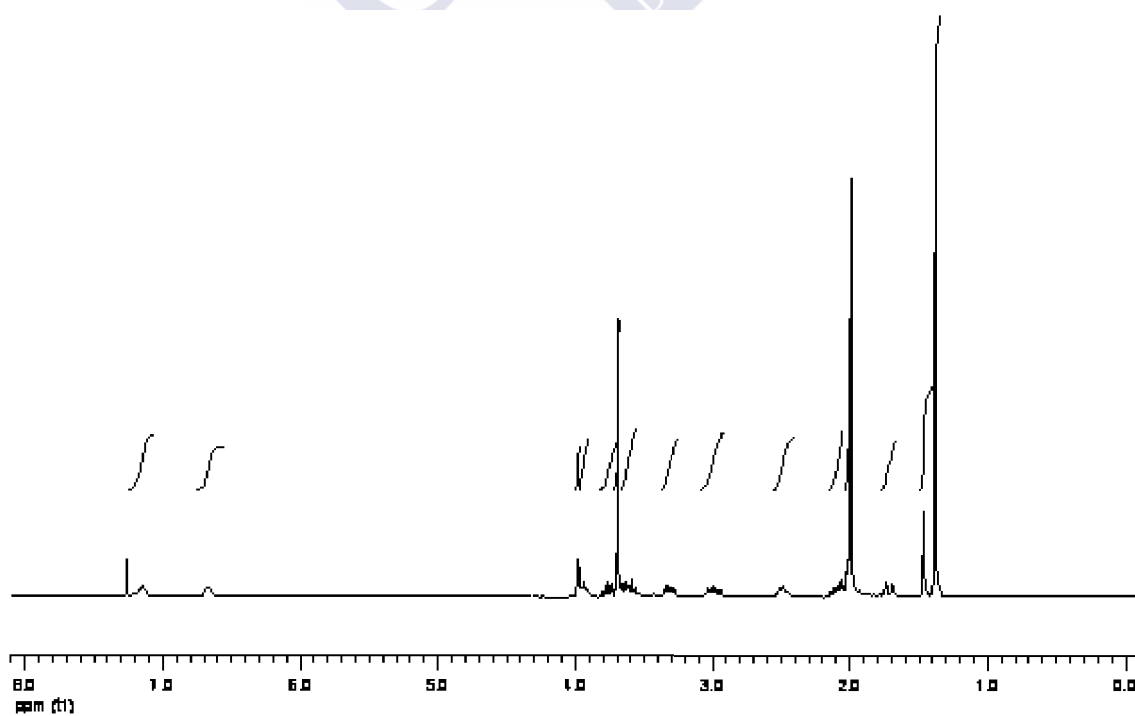
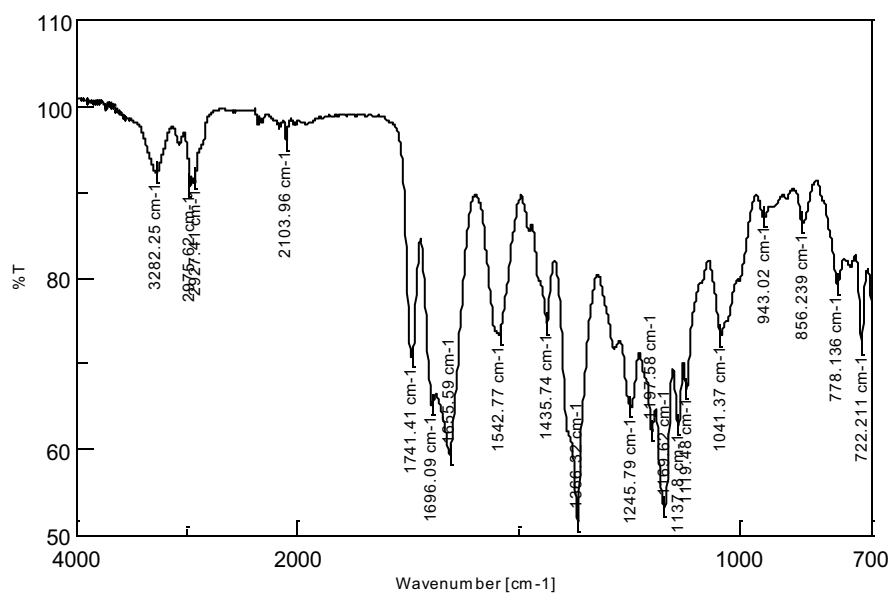
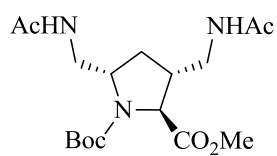
IR ν (cm⁻¹): 3282, 2975, 1741, 1696, 1656, 1543, 1436, 1366, 1246, 1198, 1169, 1138, 1041, 778.

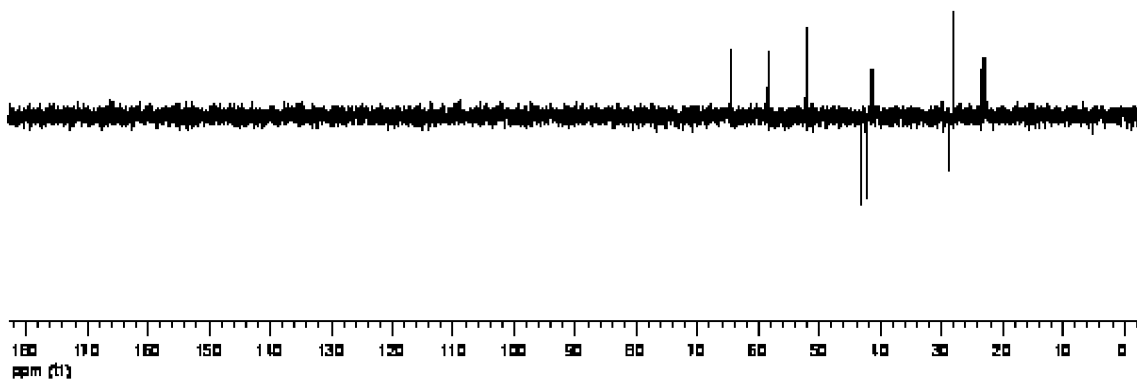
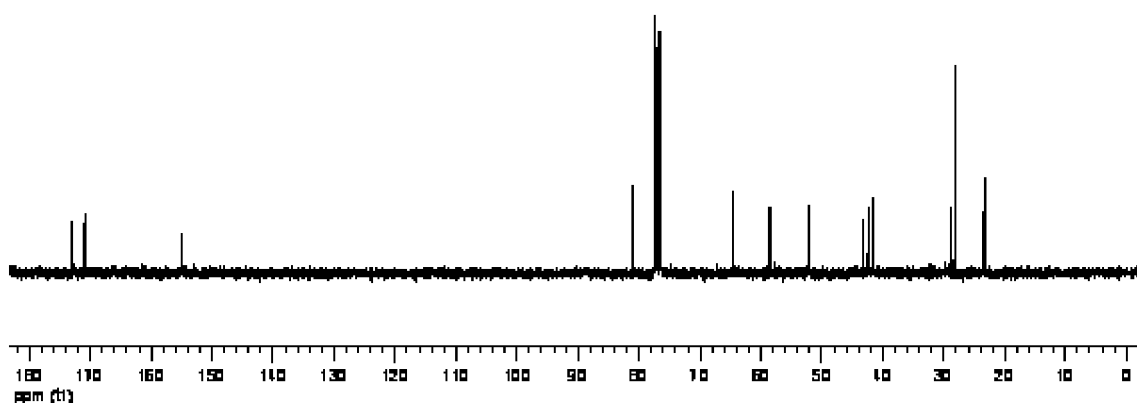
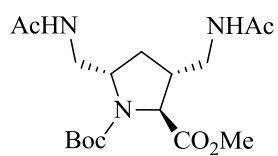
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,16-7,12 (m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 6,68-6,66 (m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 3,98 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, 2-H), 3,96-3,91 (m, 1H), 3,81-3,71 (m, 1H), 3,69 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,61 (dt, *J* = 13,8, 8,2 Hz, 1H, 5-H), 3,31 (dt, *J* = 13,7, 5,0 Hz, 1H), 3,04-2,94 (m, 1H), 2,51-2,46 (m, 1H), 2,14-2,04 (m, 1H, 4-HH), 2,0 (s, 3H, CH₃), 1,99 (s, 3H, CH₃), 1,71 (dt, *J* = 13,7, 2,8 Hz, 1H, 4-HH), 1,47 (s, 3H, CH₃), 1,38 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,89 (C), 171,14 (C), 170,84 (C), 154,97 (C), 80,96 (C), 64,54 (CH), 58,52 (CH), 52,14 (CH₃), 43,32 (CH₂), 42,41 (CH₂), 41,50 (CH), 28,87 (CH₂), 28,14 (3 CH₃), 23,45 (CH₃), 23,13 (CH₃).

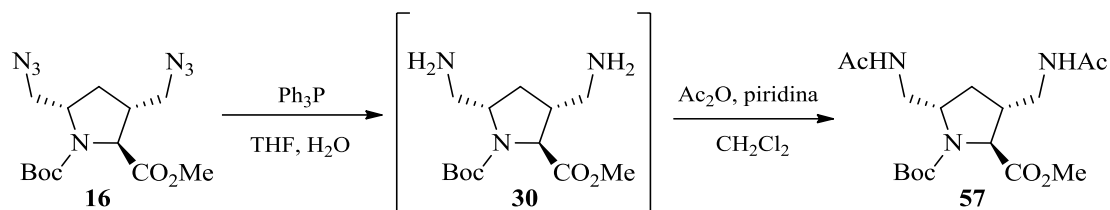
EM-IQ *m/z* (%): 372 [(M + 1)⁺, 13], 344 (23), 316 (18), 300 (22), 273 (69), 272 (100), 256 (18), 254 (45), 213 (17), 199 (80), 153 (37), 80 (19), 60 (45), 57 (67), 56 (23), 55 (21).

Microanálisis. Calculado para C₁₇H₂₉N₃O₆ (371,43): C 54,97, H 7,87, N 11,31. Encontrado: C 55,29, H 8,09, N, 11,65.



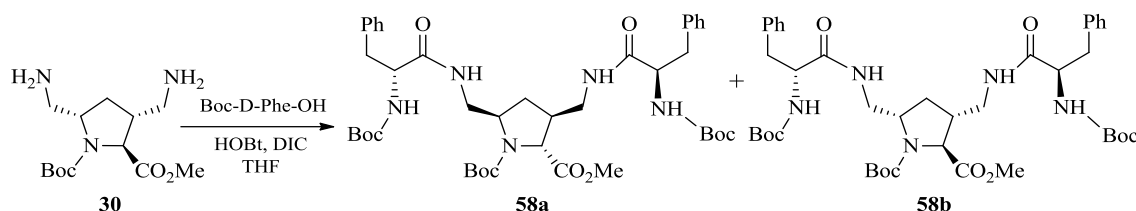


3.25.2. Método B



Sobre una disolución de **16** (0,15 g, 0,44 mmol) en THF (5 mL) se añadió gota a gota Ph_3P (0,24 g, 0,93 mmol) y la mezcla se agitó a 70 °C durante 5,5 h. A continuación se añadió H_2O (0,66 mL) y se mantuvo la agitación a 40 °C durante 15 h. Los disolventes se eliminaron bajo presión reducida por coevaporación azeotrópica con tolueno (3×10 mL) y etanol (10 mL). Al residuo resultante se le añadió CH_2Cl_2 (3 mL), piridina (0,21 mL, 2,65 mmol) y Ac_2O (0,17 mL, 1,77 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente 4 h, tras las cuales se diluyó con H_2O (20 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3×15 mL); la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se eliminó a vacío, resultando un residuo pastoso (0,47 g) que se fraccionó mediante cromatografía en columna empleando como soporte gel de sílice y como eluyente hexano/EtOAc (3:1). La eliminación a vacío del disolvente de las fracciones que contenían producto, condujo a **57** mezclado con Ph_3PO (0,18 g). El rendimiento de **57** (~ 45%) fue calculado mediante el análisis del espectro ^1H RMN de dicha mezcla.

3.26. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-N-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis[[[(*D*-*N*-*tert*-butoxicarbonil)fenilalanil]amino]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (mezcla de **58a** y **58b**)**



El Boc-D-Phe-OH (240 mg, 0,91 mmol) se coevaporó con THF recién destilado (3 × 6 mL) y sobre una disolución del mismo en THF seco (6 mL) enfriada mediante un baño de hielo se añadió HOBt (162 mg, 1,20 mmol). La mezcla de reacción se agitó 10 min y a continuación se añadió, gota a gota, DIC (186 µL, 1,20 mmol), tras lo cual se mantuvo la agitación otros 10 min y se añadió mediante jeringa una disolución de **30** (100 mg, 0,35 mmol) en THF seco (4 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente 3 h, el THF se eliminó bajo presión reducida y el residuo resultante se tomó en H₂O (30 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (15 mL) y H₂O (15 mL) y se secaron sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a vacío proporcionó un sólido blanco (400 mg) que se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de hexano/AcOEt (3:1 y 1:1), proporcionando tras la eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto, un residuo sólido (280 mg), constituido por una mezcla de compuestos, cuyo espectro de ¹H RMN indicaba la presencia de **58**. La separación mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice 60 GF₂₅₄, eluyente hexano/AcOEt (1:2)) de esta mezcla, permitió aislar varias fracciones enriquecidas en **58**, que tras la eliminación de los disolventes a vacío rindieron otro residuo sólido (170 mg) del que mediante una nueva cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente hexano/AcOEt (3:1, 2:1 y 1:1) se aisló la mezcla de **58a** y **58b** como un sólido blanco (56 mg, 21%), p.f. = 89–92 °C,.

IR ν (cm⁻¹): 3294, 2978, 2930, 1743, 1692, 1681, 1654, 1519, 1455, 1365, 1248, 1165, 1020, 737.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,34 -6,90 (m, 10H), 5,27-5,24 (m, 1H), 5,08-5,04 (m, 1H), 4,43-4,35 (m, 2H, intercambian con D₂O, 2 NH), [4,01-4,0 (m) y 3,90 (d, *J* = 2,5 Hz), 1H], 3,70 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,68-3,62 (m, 1H), 3,54-3,44 (m, 1H), 3,32-3,24 (m, 1H), 3,11-2,97 (m, 5H), 2,35-2,28 (m, 1H), 1,92-1,82 (m, 2H), 1,53-1,43 (m, 3H), 1,39, 1,38 y 1,36 (3 s, 27H, 9 CH₃).

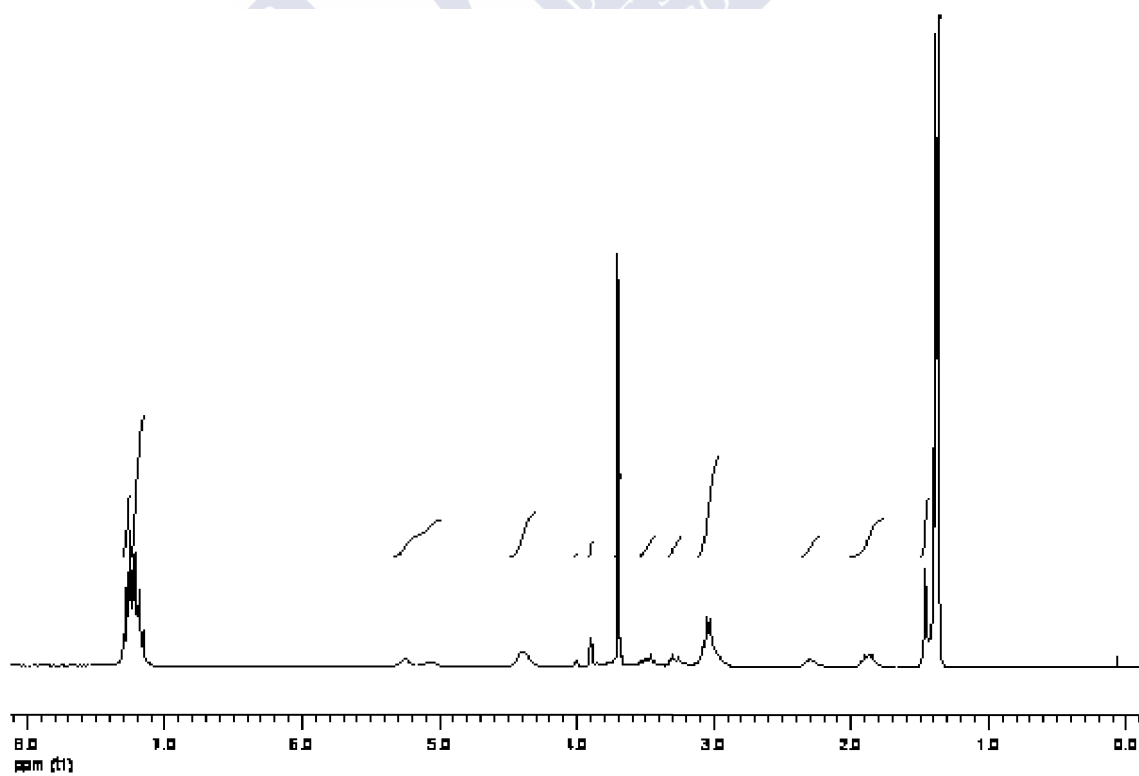
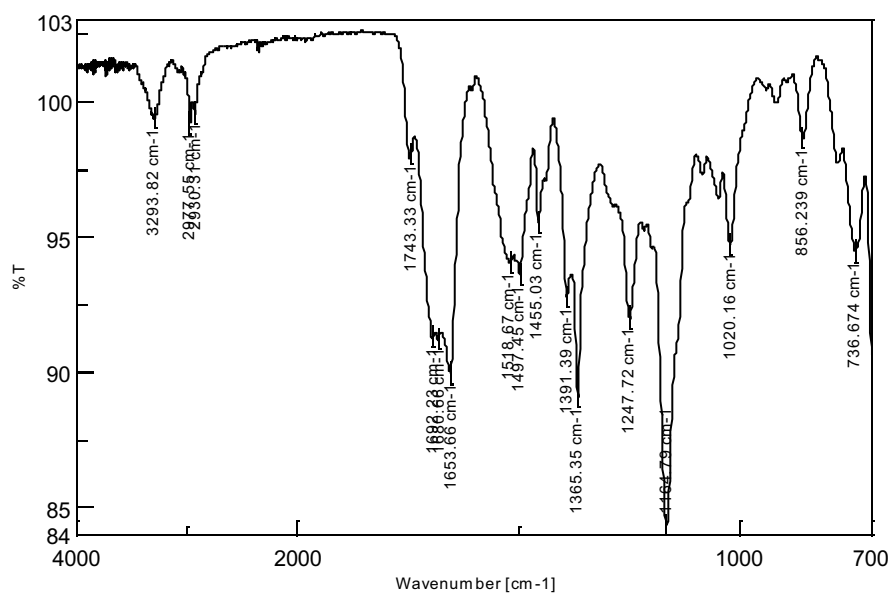
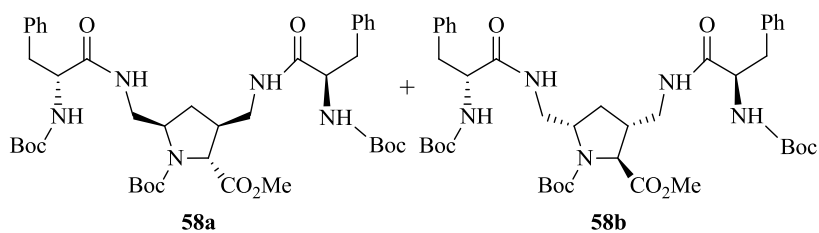
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,73 (2 C), 171,75 (C), 155,38 (C), 154,62 (2 C), 136,81 (C), 136,55 (C), 129,35 (2 CH), 129,22 (2 CH), 128,65 (2 CH), 128,52 (2 CH), 127,0 (CH), 126,83 (CH), 81,01

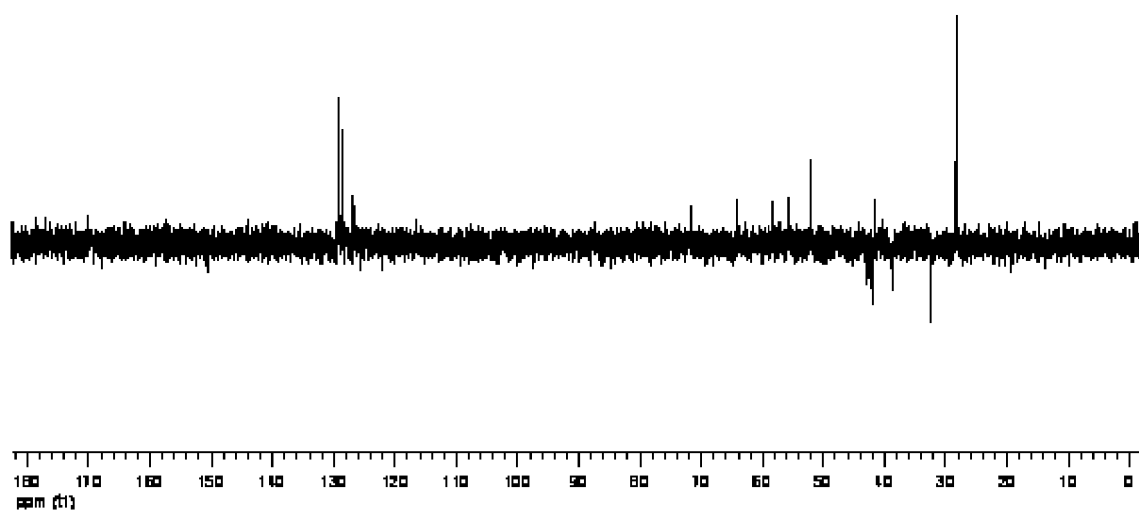
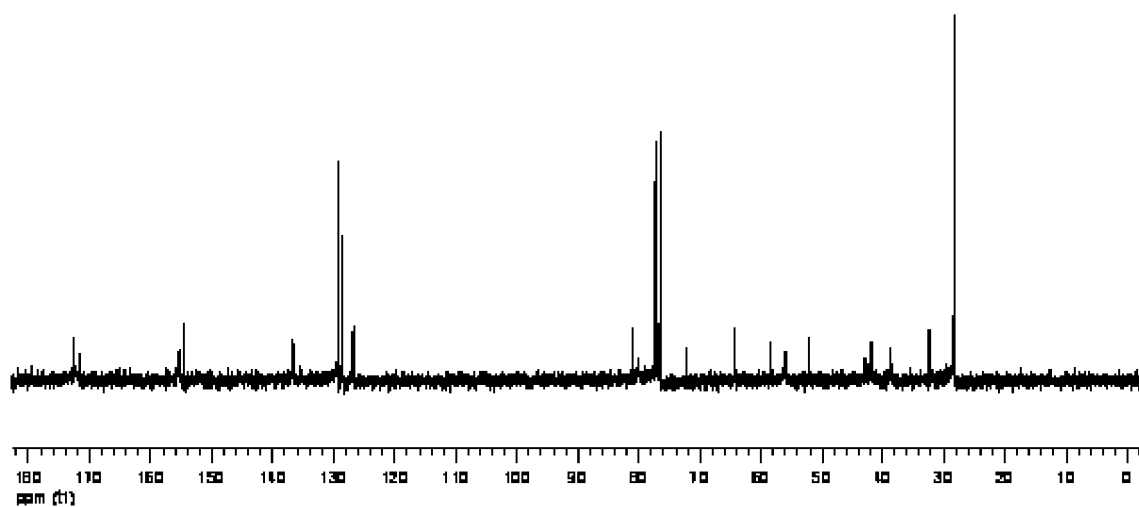
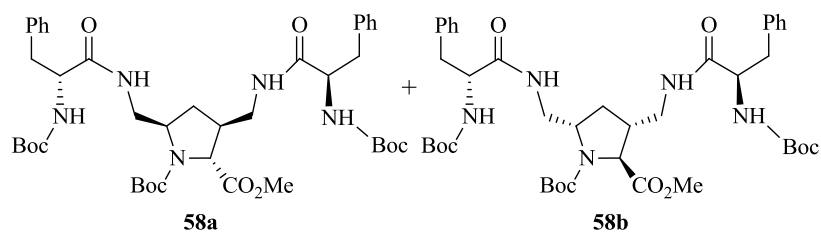
(C), 80,95 (2 C), 72,25 (CH), 64,27 (CH), 58,34 (CH), 55,96 (CH), 52,14 (CH₃), 42,83 (CH₂), 42,46 (CH₂), 42,06 (CH₂), 41,57 (CH), 38,59 (CH₂), 32,33 (CH₂), 28,29 y 28,14 (9 CH₃).

EM-IE-TVD m/z (%): 804.4 [(M + Na)⁺, 100].

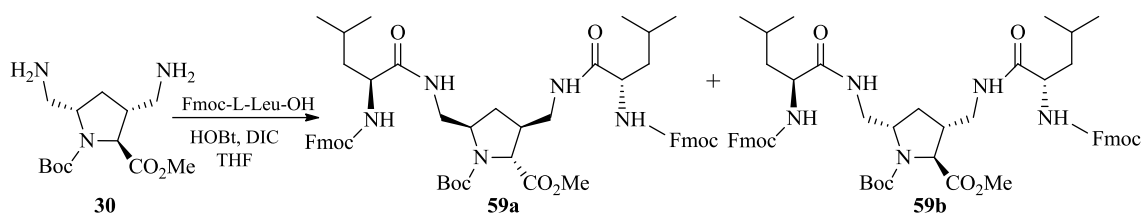
Microanálisis. Calculado para C₄₁H₅₉N₅O₁₀ (781,93): C 62,98, H 7,61, N 8,96. Encontrado: C 63,25, H 7,87, N, 9,18.







3.27. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-*N*-(*tert*-Butoxicarbonil)-3,5-bis[[(2*S*)-2-[[[(9*H*)-fluoren-9-ilmetoxi]carbonyl]amino]-4-metilpentanoil]amino]metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (mezcla de **59a** y **59b**)**



Se siguió el procedimiento descrito anteriormente para la preparación de **58** (véase apartado 3.26), pero utilizando Fmoc-L-Leu-OH (320 mg, 0.91 mmol), tiempo de reacción 4 h. El fraccionamiento del residuo sólido obtenido (475 mg) por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente hexano/AcOEt (1:3), condujo a una mezcla varios compuestos (320 mg) que se fraccionó por cromatografía capa fina preparativa (gel de sílice 60 GF₂₅₄, hexano/AcOEt (1:2)). De las fracciones que contenían producto (200 mg), se aisló por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (3:1), la mezcla de **59a** y **59b** como un sólido blanco (25 mg, 7%), p.f. = 91–93 °C.

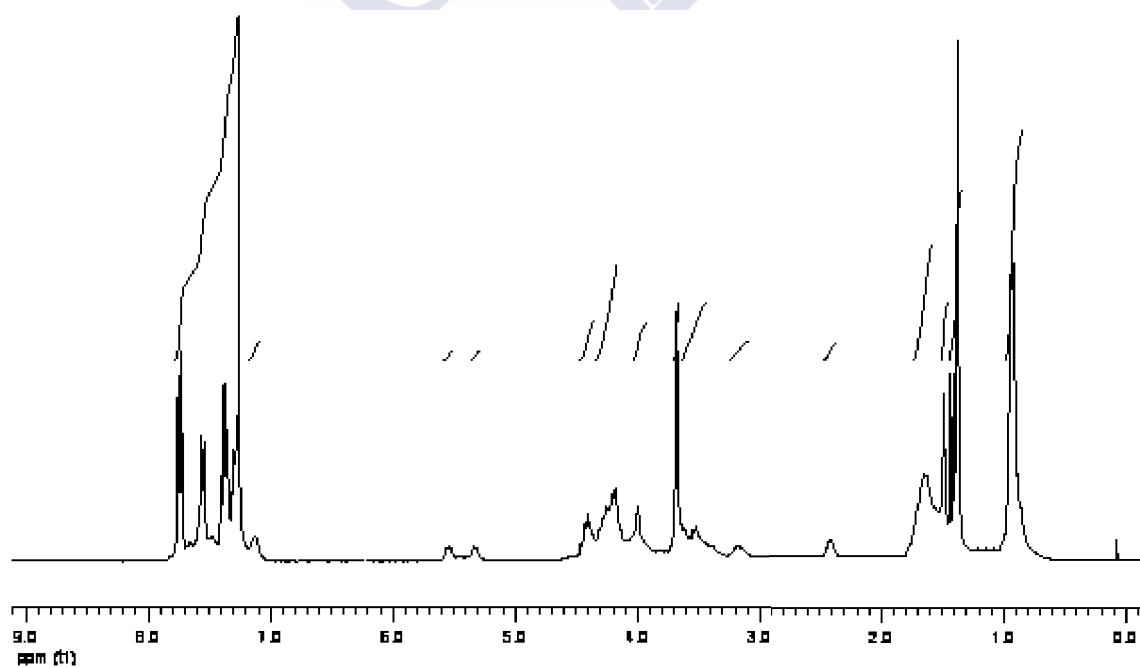
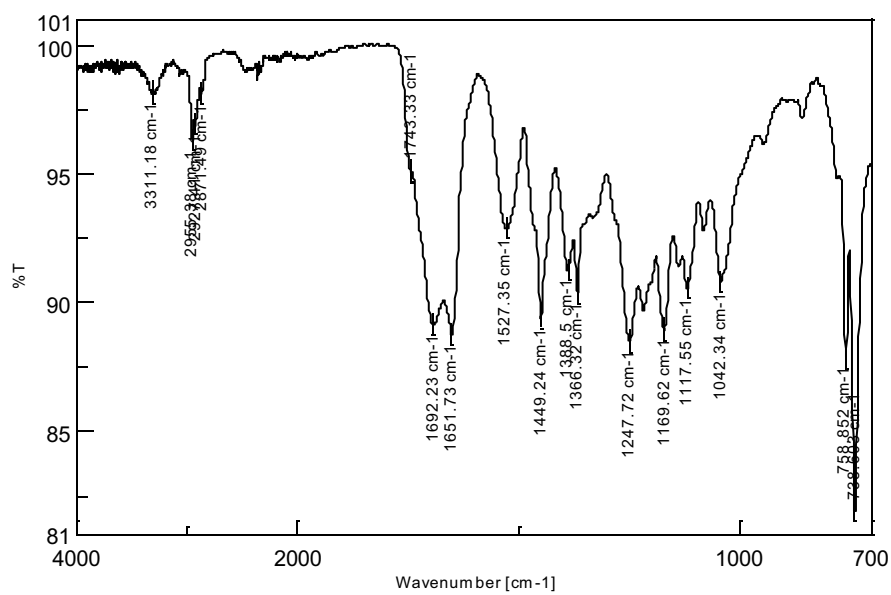
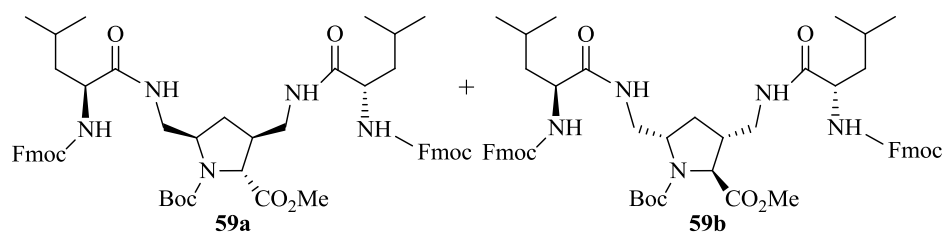
IR v (cm⁻¹): 3311, 2955, 2927, 1743, 1692, 1652, 1527, 1449, 1366, 1248, 1170, 1042, 739.

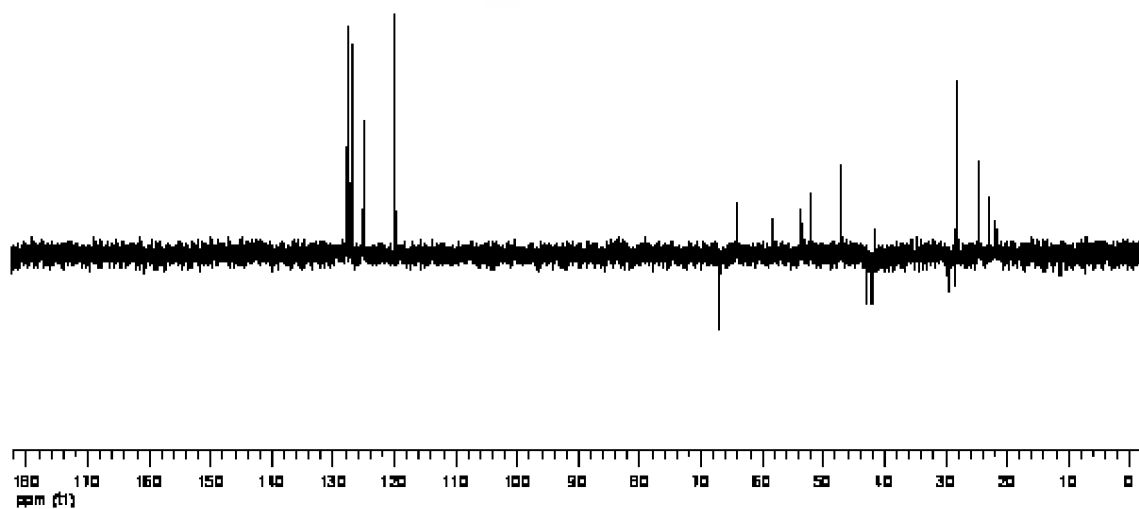
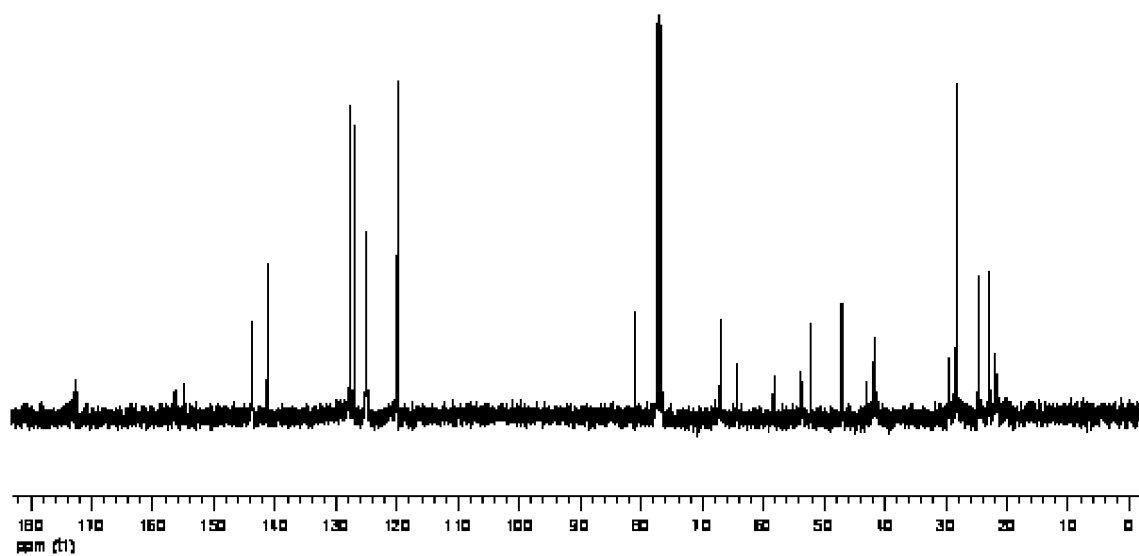
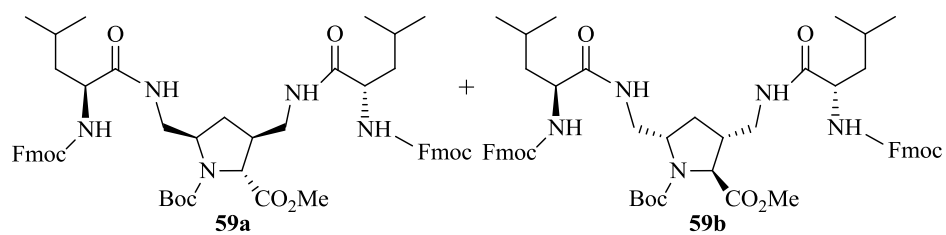
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): [7,72 (d, *J* = 7,5 Hz), 7,67-7,62 (m), 7,54 (d, *J* = 7,2 Hz), 7,48-7,42 (m), 7,39-7,32 (m), 7,31-7,28 (m), 18H, 2 de ellos intercambian con D₂O, 2 NH y 8H x 2 Flu), 7,18-7,11 (m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 5,57-5,53 y 5,34-5,31 (2 m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,46-4,37 (m, 2H), 4,31-4,18 (m, 5H), 4,03-3,93 (m, 2H), 3,67 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,61-3,43 (m, 3H), 3,22-3,11 (m, 1H), 2,43-2,39 (m, 1H), 1,70-1,47 (m, 7H), 1,43, 1,41 y 1,37 (3 s, 9H, 3 CH₃), 0,93-0,88 (m, 12H, 4 CH₃_{Leu}).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,78 (2 C), 172,36 (C), 156,43 (C), 156,26 (C), 154,82 (C), 143,75 (4 C), 141,25 (4 C), 127,68 (4 CH), 127,01 (4 CH), 125,01 (4 CH), 119,93 (4 CH), 81,0 (C), 67,03 (2 CH₂), 64,23 (CH), 58,22 (CH), 53,73 (CH), 53,42 (CH), 52,11 (CH₃), 47,11 (CH), 47,08 (CH), 42,90 (CH₂), 42,09 (CH₂), 41,64 (CH), 29,66 (CH₂), 28,65 (CH₂), 28,59 (CH₂), 28,35 y 28,11 (3 CH₃), 24,68 (2 CH), 22,93 (2 CH₃), 22,09 (CH₃), 21,78 (CH₃).

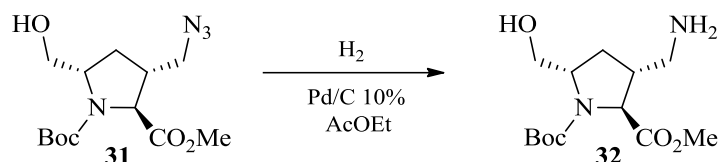
EM-IE-TDV *m/z* (%): 980 [(M + Na)⁺, 100]

Microanálisis. Calculado para C₅₅H₆₇N₅O₁₀ (958,15): C 68,94, H 7,05, N 7,31. Encontrado: C 69,20, H 7,25, N, 7,48.





3.28. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3-Aminometil-1-(*terc*-butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (32)**



Se siguió el procedimiento descrito anteriormente para la preparación de **30** (véase apartado 3.24), utilizando como compuesto de partida **31** (500 mg, 1,59 mmol) y Pd/C 10% (54 mg, 0,51 mmol). Tras la elaboración habitual y posterior fraccionamiento del residuo obtenido por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente hexano/AcOEt (1:1), se aisló **32** (320 mg, 70%) como un aceite incoloro.

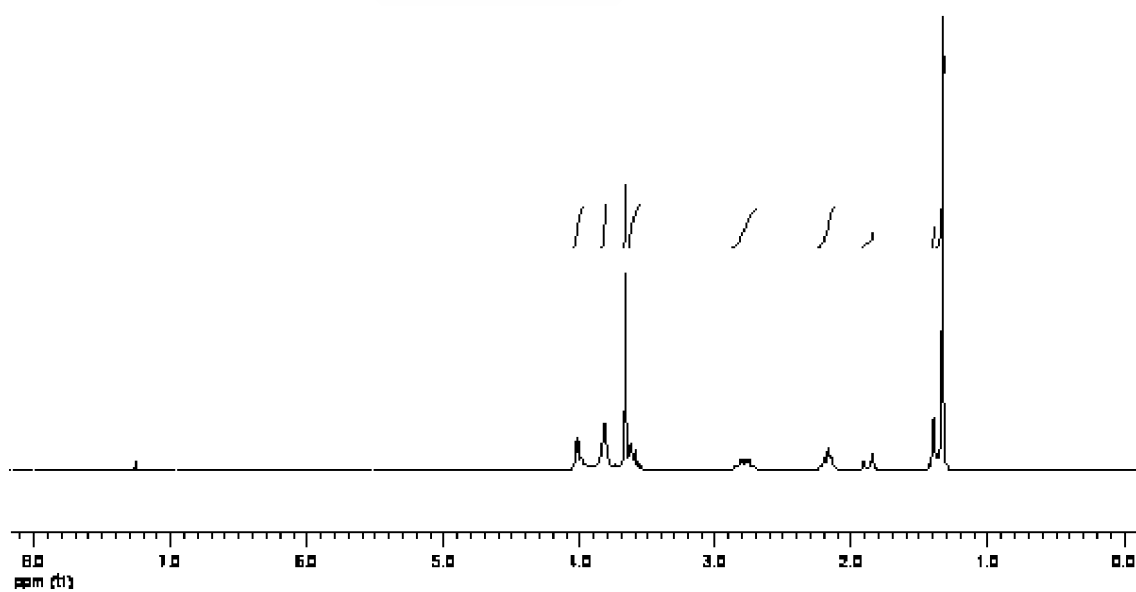
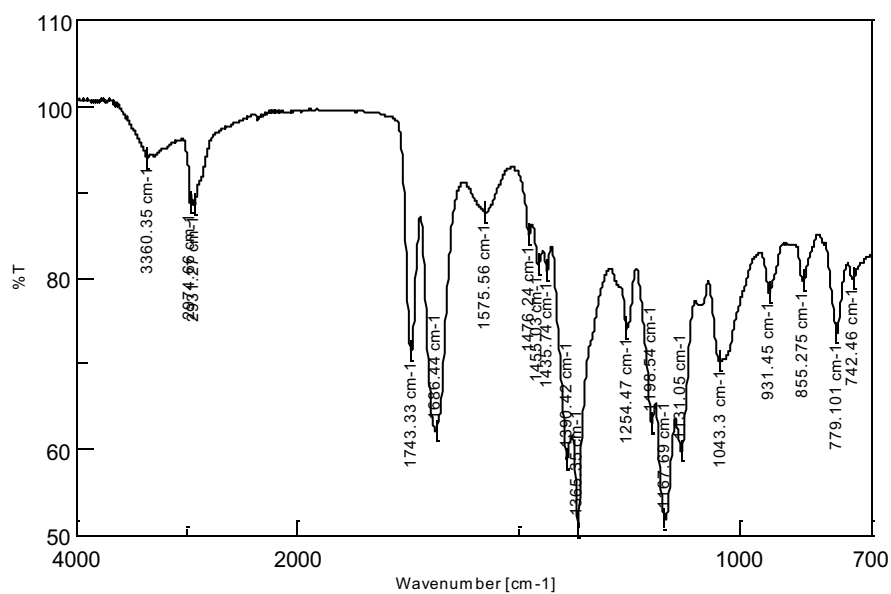
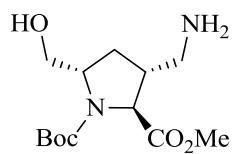
IR v (cm⁻¹): 3360, 2932, 1743, 1686, 1390, 1365, 1254, 1198, 1168, 1131, 1043, 779.

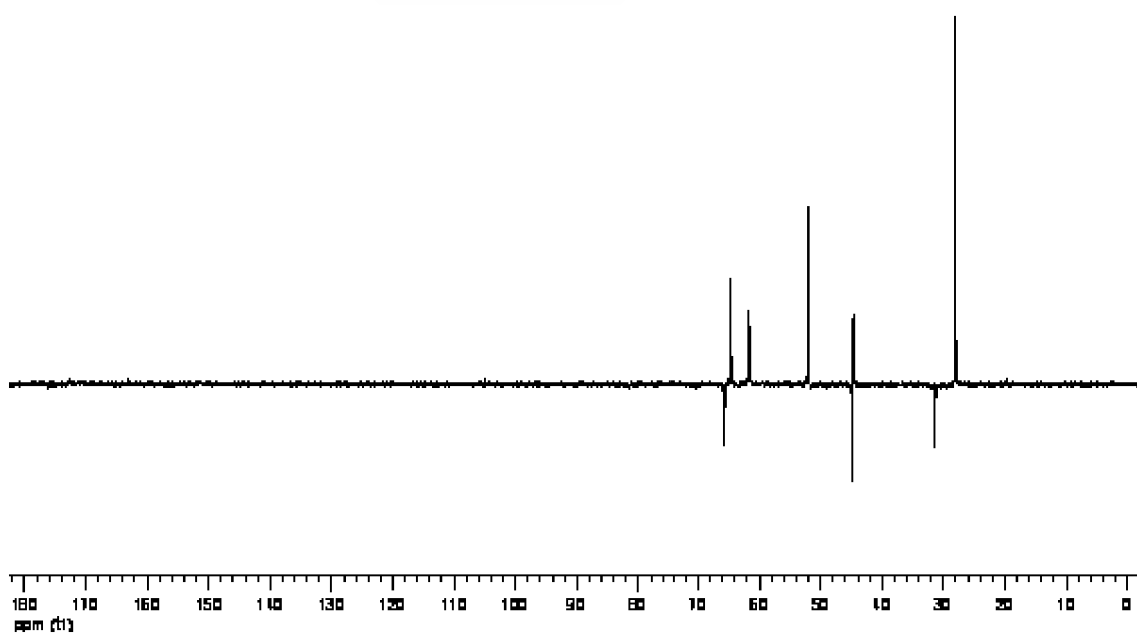
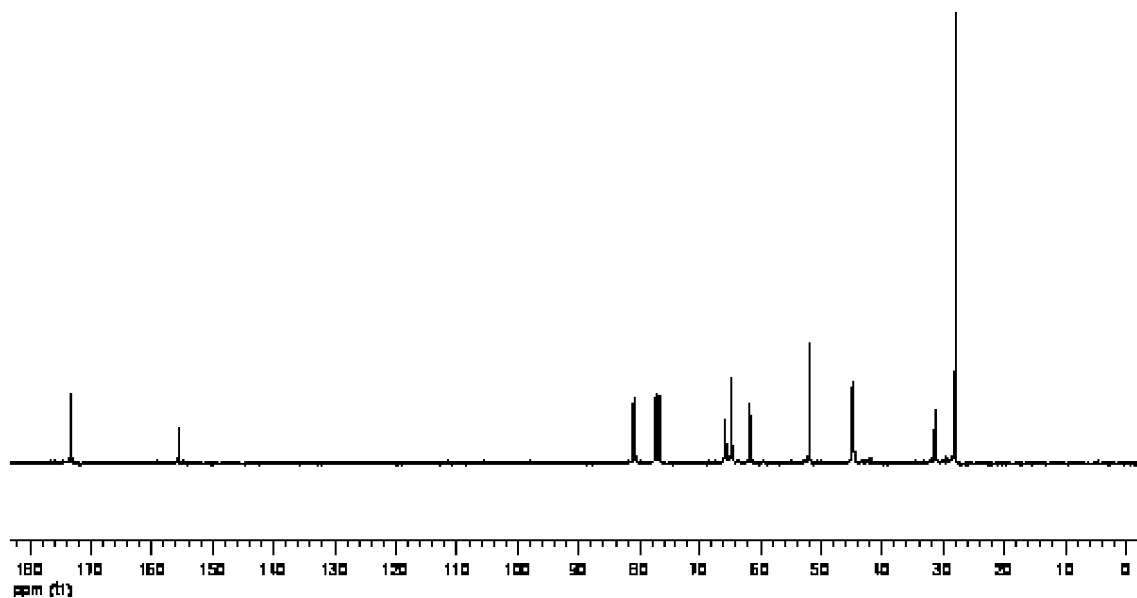
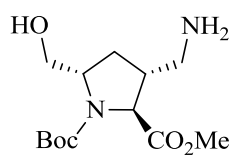
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 4,10-3,91 (m, 2H), 3,82 (s an, 2H, intercambian con D₂O, NH₂), 3,67 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,64-3,56 (m, 2H), 2,86 y 2,74 (parte AB de un sistema ABM, *J* = 25,8, 12,7, 6,1 Hz, 2H, CH₂OH), 2,28-2,22 (m, 1H), 2,17 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,91-1,84 (m, 1H, intercambia con D₂O, OH), 1,45-1,35 (m, 1H, 4-*HH*), 1,31 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,29 (C), 155,59 (C), 81,02 (C), 65,69 (CH₂), 64,71 (CH), 61,64 (CH), 51,97 (CH₃), 44,88 (CH₂), 44,60 (CH), 31,34 (CH₂), 28,05 (3 CH₃).

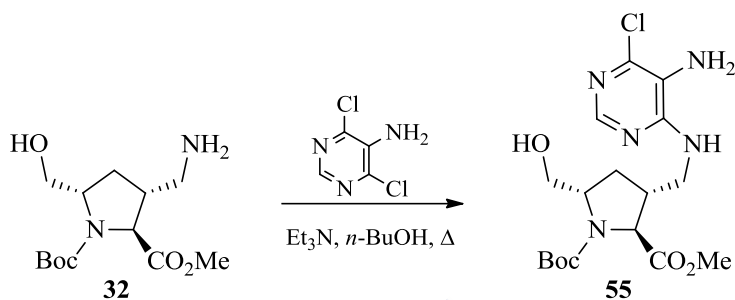
EM-IE-TDV *m/z*: 289 [(*M* + 1)⁺, 10], 233 (47), 189 (100), 100 (34).

EM-AR *m/z*: calculado para C₁₃H₂₅N₂O₅, 289,1763; encontrado, 289,1799 [MH]⁺.





3.29. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3-[[5-Amino-6-cloropirimidin-4-il)amino]metil]-1-(*terc*-butoxicarbonil)-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (55)**



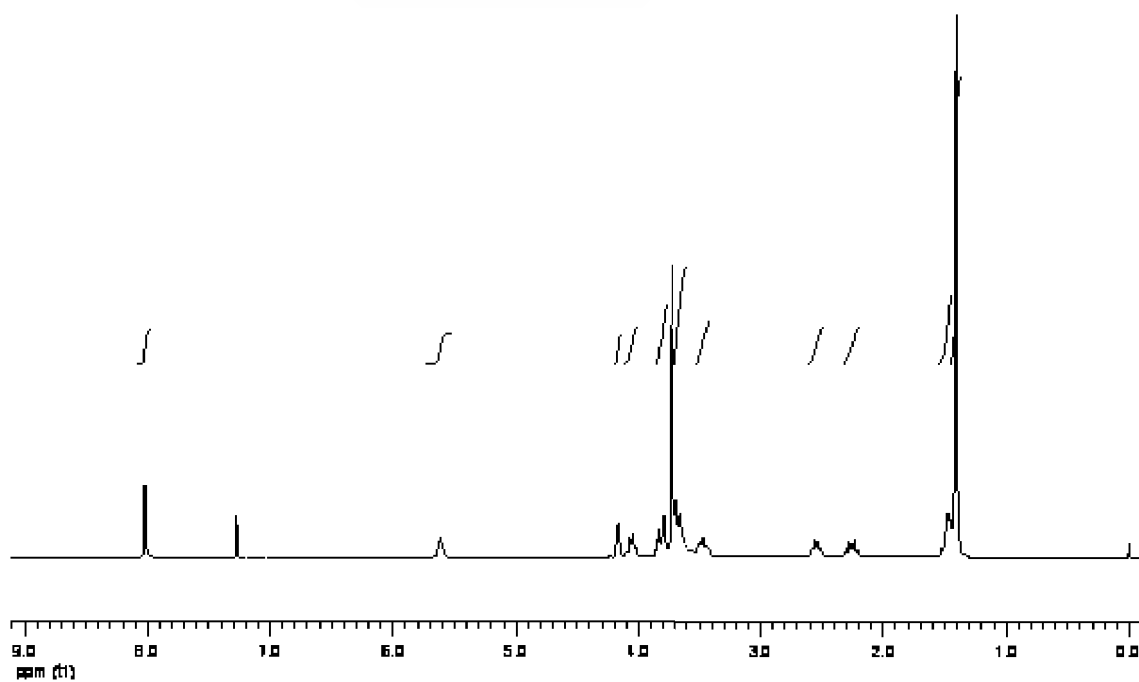
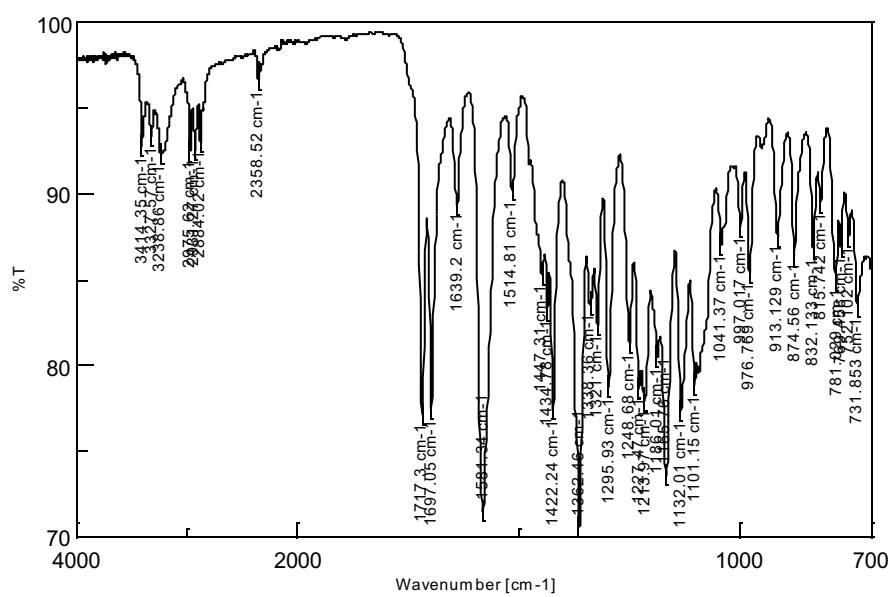
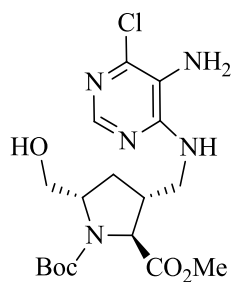
Una disolución de **32** (0,29 g, 1,01 mmol) y 5-amino-4,6-dicloropirimidina (0,29 g, 1,79 mmol) en *n*-BuOH seco (18 mL) y Et₃N seca (0,9 mL) se calentó a reflujo bajo atmósfera de argón durante 24 h. La eliminación de los disolventes bajo presión reducida condujo a un residuo sólido amarillento (0,71 g) que fue purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt (1:3), de las fracciones que contenían producto se aisló **55** (0,33 g, 76%) como un sólido beige, p.f. = 142–144 °C.

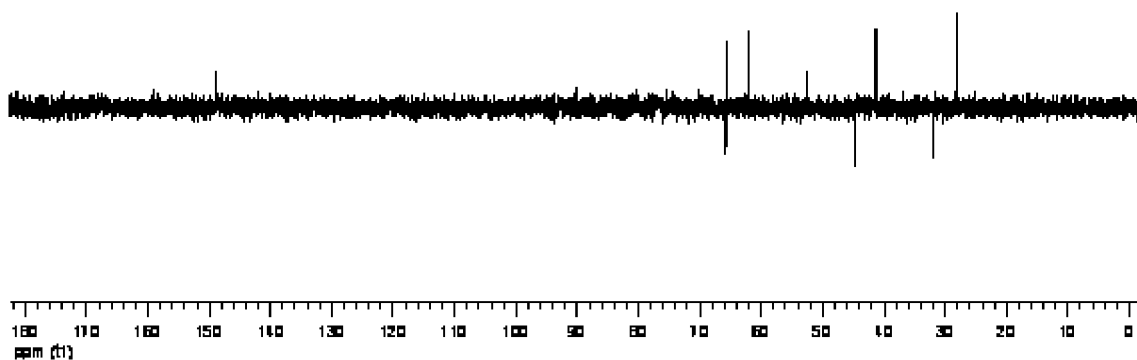
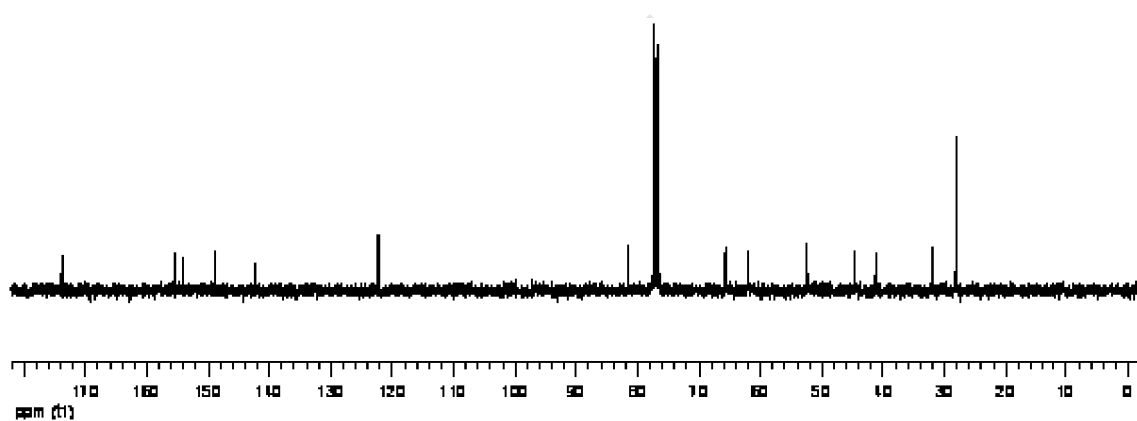
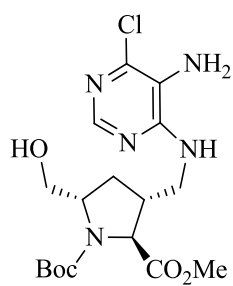
IR v (cm⁻¹): 3414, 3239, 2975, 2931, 1717, 1697, 1639, 1581, 1422, 1363, 1296, 1214, 1166, 1166, 1132, 1101, 875, 781.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,02 (s, 1H, 2-H_{pirimidina}), 5,62 (s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,17 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, 2-H), 4,07-4,03 (m, 1H), 3,84-3,77 (m, 2H), 3,73 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,70-3,65 (m, 3H, dos de ellos intercambian con D₂O, NH₂), 3,51-3,44 (m, 1H), 2,56-2,53 (m, 1H), 2,28-2,23 (m, 1H, 4-HH), 1,53-1,45 (m, 2H, uno de ellos intercambia con D₂O, OH y 4-HH), 1,41 (s, 9H, 3 CH₃).

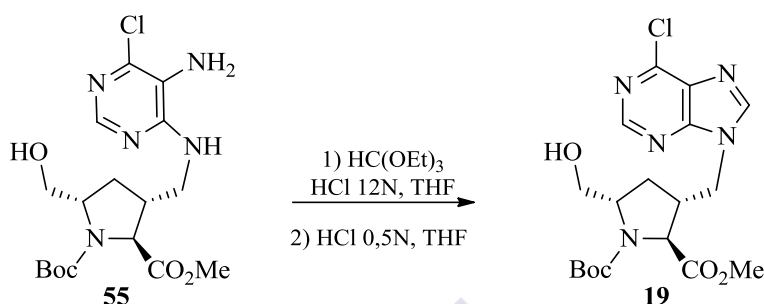
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,82 (C), 155,53 (C), 154,17 (C), 148,94 (CH), 142,21 (C), 122,25 (C), 81,66 (C), 65,78 (CH₂), 65,64 (CH), 62,04 (CH), 52,40 (CH₃), 44,72 (CH₂), 41,26 (CH), 32,09 (CH₂), 28,17 (3 CH₃).

EM-IE *m/z* (%): 416 [(M+1)⁺, 4], 415 (M⁺, 19), 359 (17), 342 (18), 317 (19), 315 (57), 286 (12), 285 (12), 284 (34), 170 (16), 160 (26), 159 (21), 158 (100), 157 (45), 145 (18), 140 (34), 112 (39), 94 (16), 82 (11), 80 (14), 68 (17), 57 (94), 56 (14), 55 (16).





3.30. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3-[(6-cloro-9*H*-purin-9-il)metil]-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (19)**

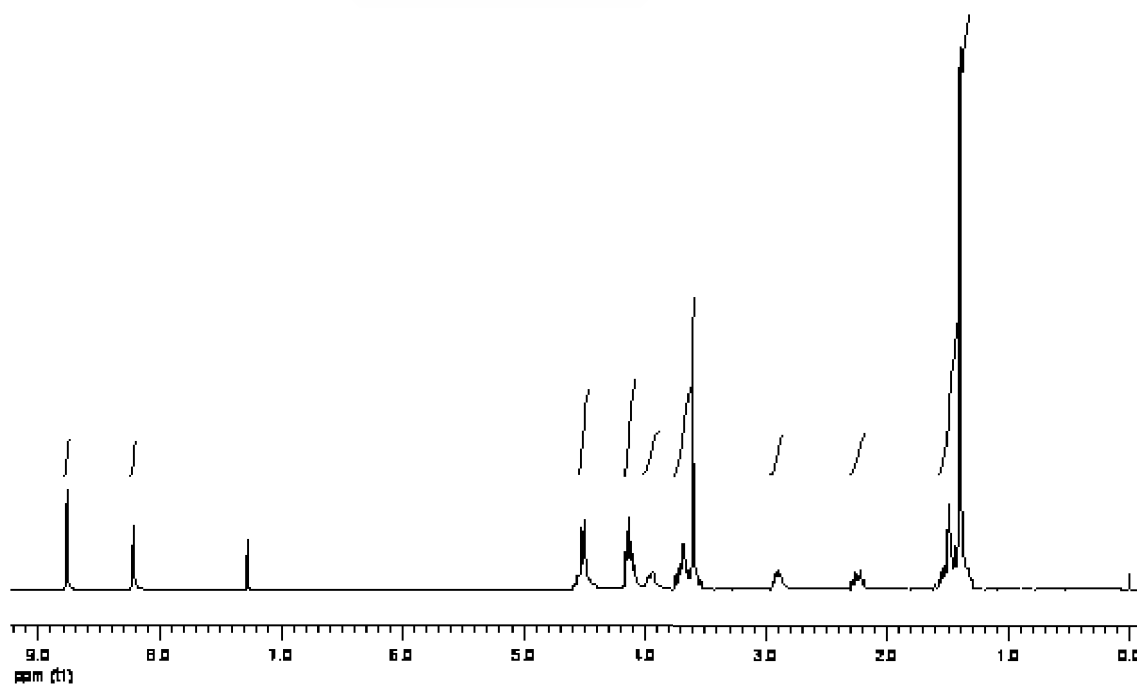
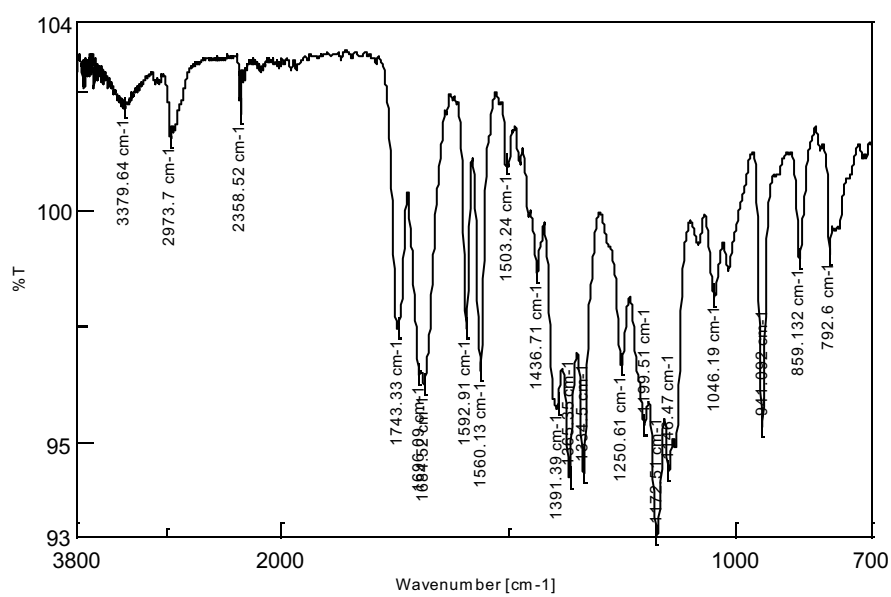
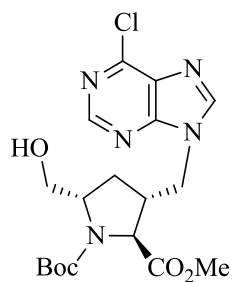


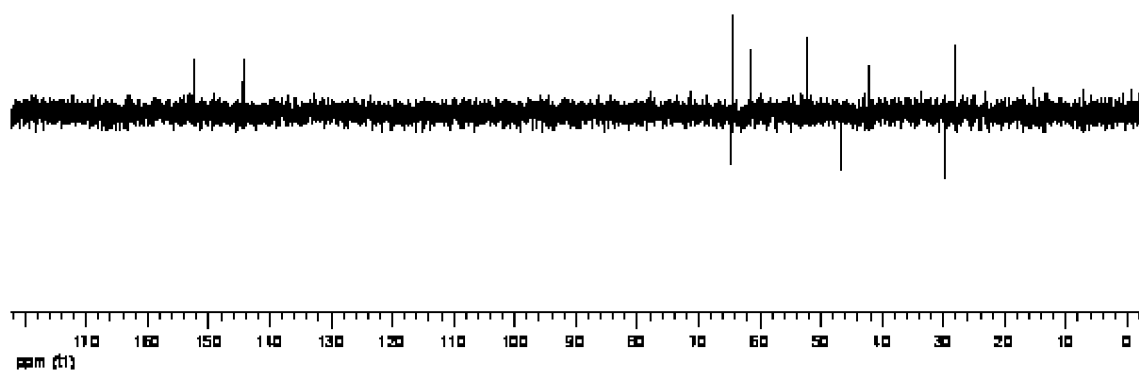
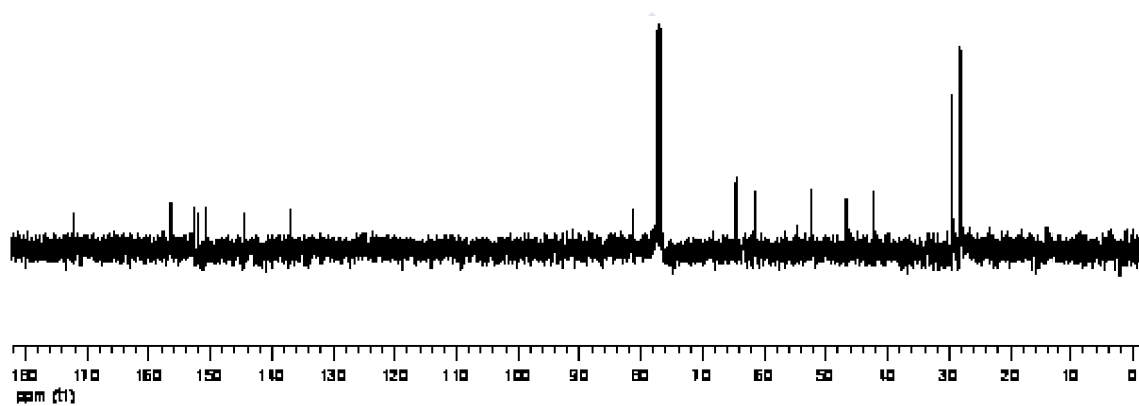
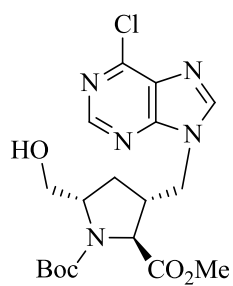
Una disolución de **55** (0,22 g, 0,53 mmol), ortoformiato de trietilo (4,8 mL, 28,6 mmol) y HCl 12N (0,4 mL) se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Una vez eliminados los disolventes bajo presión reducida, el residuo se disolvió en THF (4 mL) y se trató con HCl 0,5N (5 mL), dejándose la disolución resultante con agitación a temperatura ambiente 3 h, tras las cuales se ajustó a pH 7 con NaOH 0,5N; los disolventes fueron eliminados a vacío y el residuo sólido (0,44 g) se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt (1:3). De las fracciones que contenían producto se aisló **19** como un sólido blanco (0,12 g, 53%) de bajo punto de fusión.

IR v (cm⁻¹): 3380, 2974, 2359, 1743, 1696, 1684, 1593, 1560, 1437, 1365, 1334, 1251, 1172, 1146, 1046, 941, 859, 793.

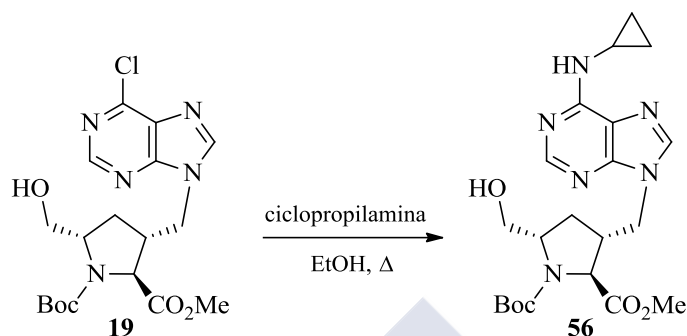
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,76 (s, 1H, 2-H_{purina}), 8,21 (s, 1H, 8-H_{purina}), 4,51 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 4,15-4,09 (m, 2H), 3,95 (d, *J* = 11,2 Hz, 1H), 3,74-3,64 (m, 1H), 3,60 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,94-2,88 (m, 1H), 2,29-2,19 (m, 1H, 4-HH), 1,56-1,42 (m, 2H, uno de ellos intercambia con D₂O, OH y 4-HH), 1,40 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,29 (C), 156,39 (C), 152,54 (CH), 152,03 (C), 150,56 (C), 144,50 (CH), 136,90 (C), 81,45 (C), 64,76 (CH₂), 64,41 (CH), 61,37 (CH), 52,28 (CH₃), 46,69 (CH₂), 42,29 (CH), 29,66 (CH₂), 28,13 (3 CH₃).





3.31. (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-(*tert*-Butoxicarbonil)-3-[(6-ciclopropilamino-9*H*-purina-9-il)me-til]-5-(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**56**)**



Sobre una disolución agitada de **19** (70 mg, 0,16 mmol) en EtOH (3 mL) se añadió ciclopropilamina (0,15 mL, 2,13 mmol) y la mezcla se refluxó durante 7 h, tras las cuales el disolvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo sólido (94 mg) resultante se sometió a purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (40:1). Una vez eliminados los disolventes de las fracciones que contenían producto se aisló **56** (50 mg, 68%), como un sólido blanco, p.f. = 72–74 °C.

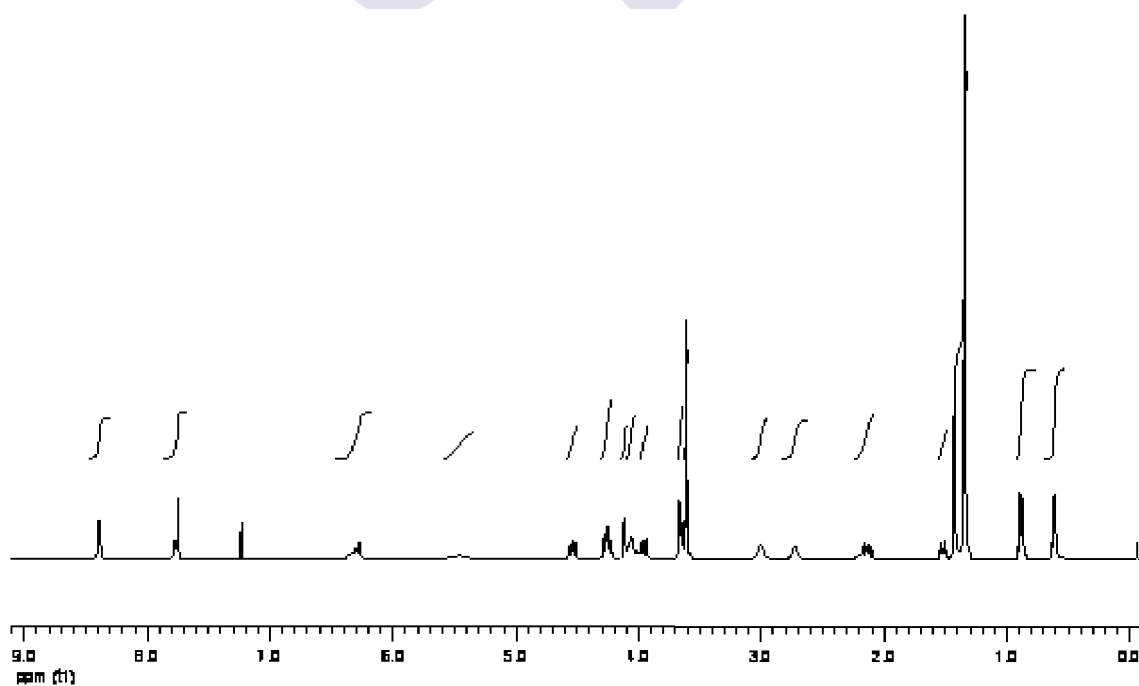
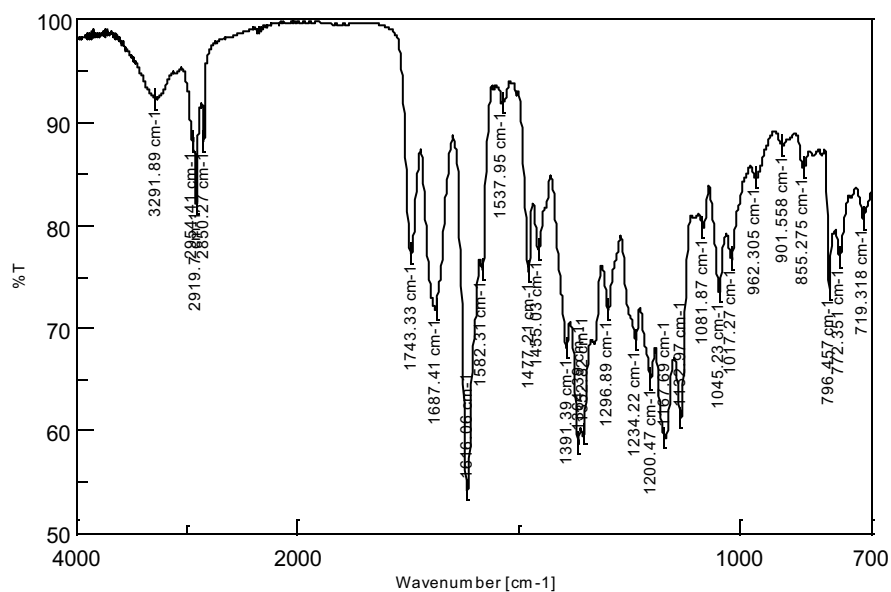
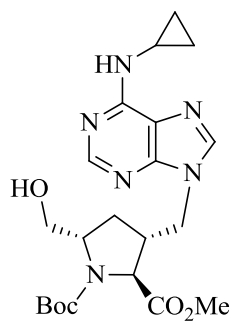
IR v (cm⁻¹): 3292, 2954, 2920, 2850, 1743, 1687, 1616, 1582, 1477, 1455, 1391, 1364, 1362, 1200, 1168, 1132, 1045, 941, 796.

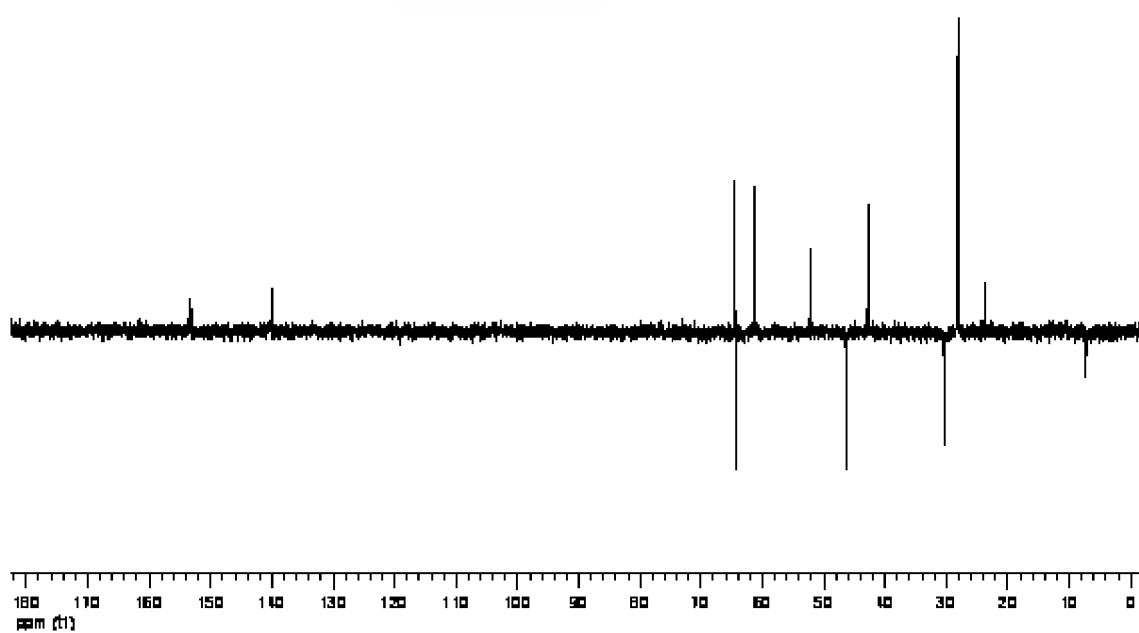
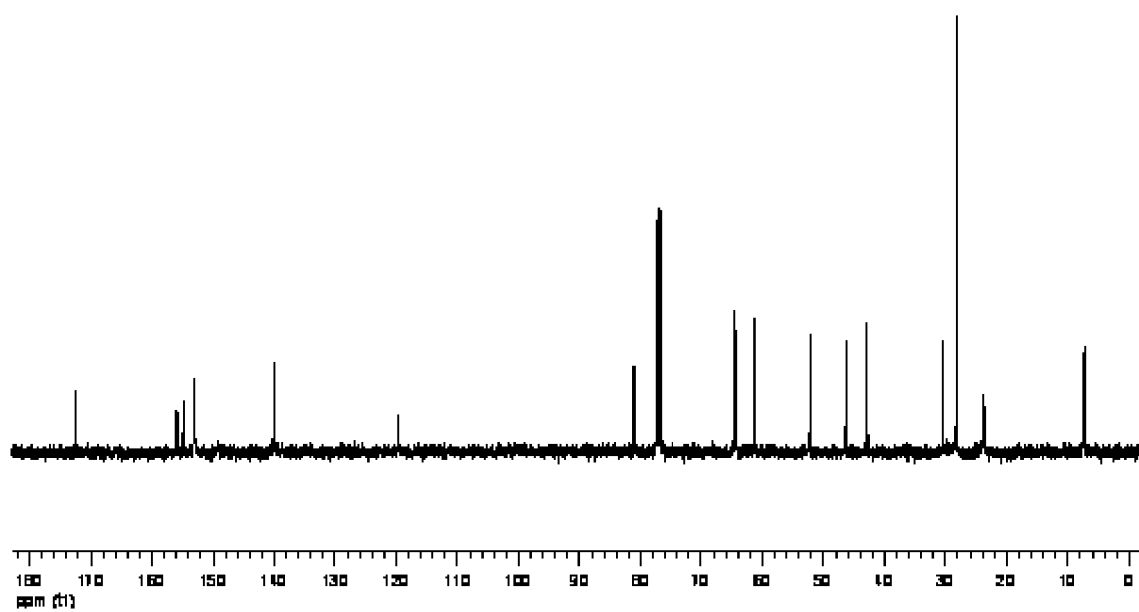
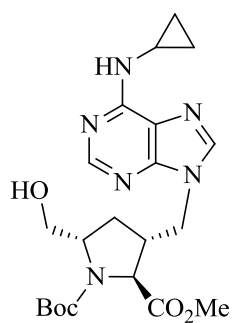
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,39 (s, 1H, 2-H_{purina}), 7,75 (s, 1H, 8-H_{purina}), 6,36-6,27 (m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 5,46 (s an 1H, intercambia con D₂O, OH), 4,57-4,51 (m, 1H), 4,29-4,23 (m, 1H), 4,12 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 4,09-4,04 (m, 1H), 3,95 (dd, *J* = 12,2, 1,9 Hz, 1H), 3,66-3,64 (m, 1H), 3,60 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,95-3,04 (m, 1H), 2,77-2,69 (m, 1H), 2,21-2,10 (m, 1H, 4-HH), 1,55-1,49 (m, 1H, 4-HH), 1,43 (s, 3H, CH₃), 1,35 (s, 6H, 2 CH₃), 0,91-0,86 (m, 2H), 0,63-0,59 (m, 2H).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,48 (C), 155,92 (C), 154,89 (C), 153,20 (CH), 153,00 (C), 139,97 (CH), 119,64 (C), 81,13 (C), 64,43 (CH), 64,17 (CH₂), 61,27 (CH), 52,20 (CH₃), 46,28 (CH₂), 42,79 (CH), 30,39 (CH₂), 28,13 (3 CH₃), 23,71 (CH), 7,29 (2 CH₂).

EM-IE *m/z* (%): 447 [(*M* + 1)⁺, 18], 446 (*M*⁺, 61), 390 (39), 373 (38), 346 (83), 316 (32), 315 (28), 190 (25), 189 (79), 188 (60), 177 (23), 176 (100), 175 (24), 174 (40), 170 (21), 160 (38), 139 (23), 112 (33), 80 (28), 57 (96), 56 (36), 55 (26).

Microanálisis. Calculado para C₂₁H₃₀N₆O₅ (446,50): C 56,49, H 6,77, N 18,82. Encontrado: C 56,83, H 7,05, N, 19,12.



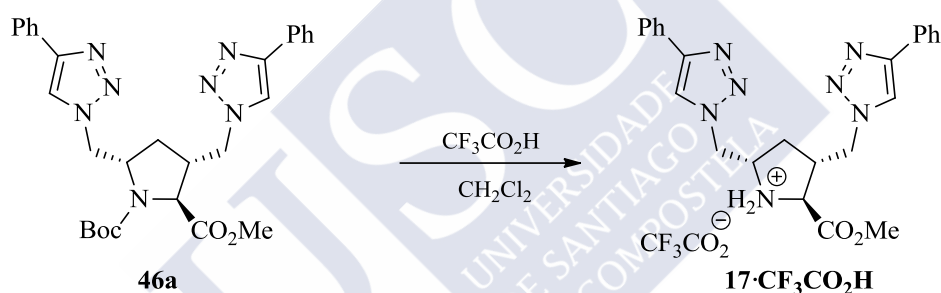


3.32. Formación de los trifluoroacetatos 17, 23 y 61

3.32.1. Método general

Sobre una suspensión agitada del derivado a desproteger (1 mmol) en CH_2Cl_2 seco, enfriada mediante un baño de hielo y bajo atmósfera de argón, se añade $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (1,54 mL, 20,00 mmol). La disolución resultante se mantiene con agitación a temperatura ambiente de 2 a 6 h y posteriormente los disolventes se eliminan bajo presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna o mediante lavados con $\text{AcOEt}/\text{Et}_2\text{O}$.

3.32.2. Trifluoroacetato de (\pm) -(2*R**,3*S**,5*R**)-3,5-bis-[(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo ($17 \cdot \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$)



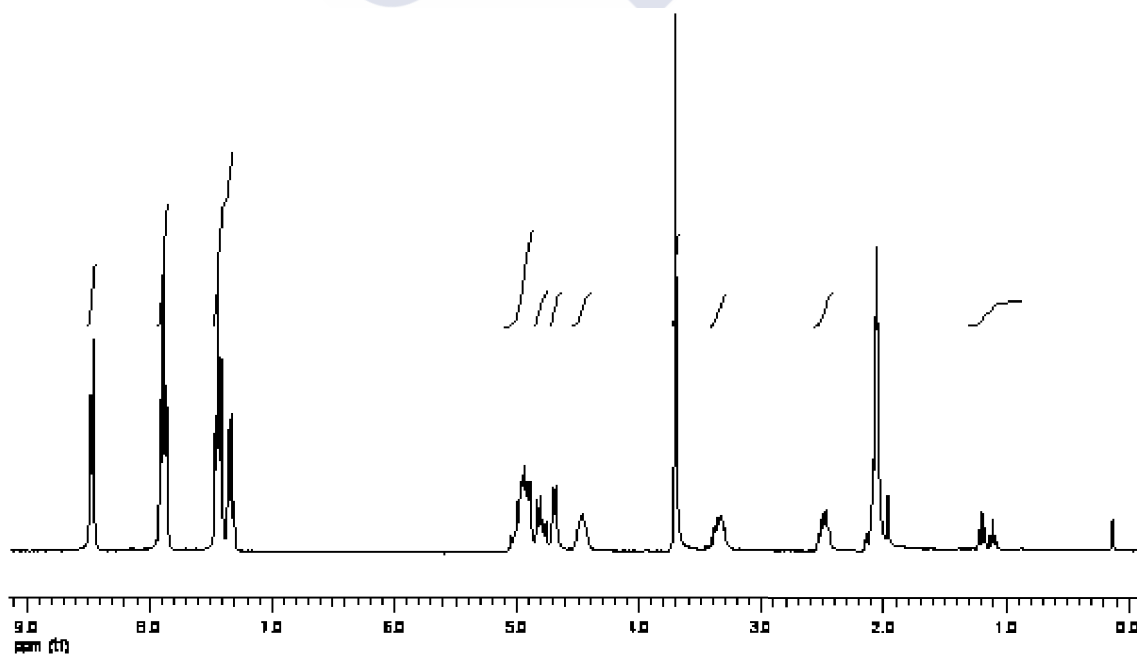
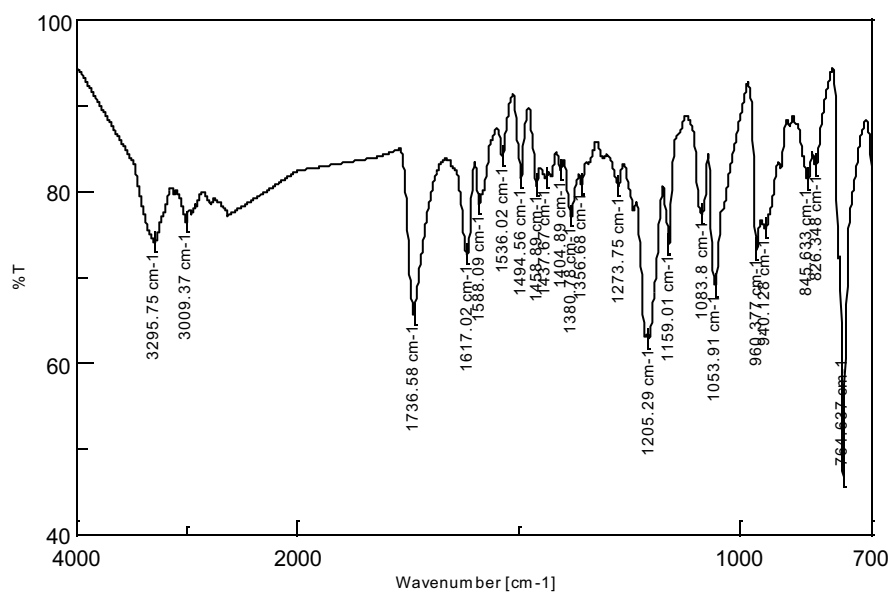
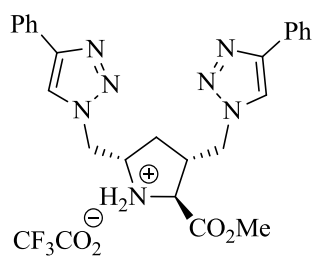
Tiempo de reacción: 3 h. El residuo marrón obtenido fue tratado con una mezcla de $\text{AcOEt}/\text{Et}_2\text{O}$, precipitando $17 \cdot \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (71%) como un sólido blanquecino, p.f. = 159–161 °C.

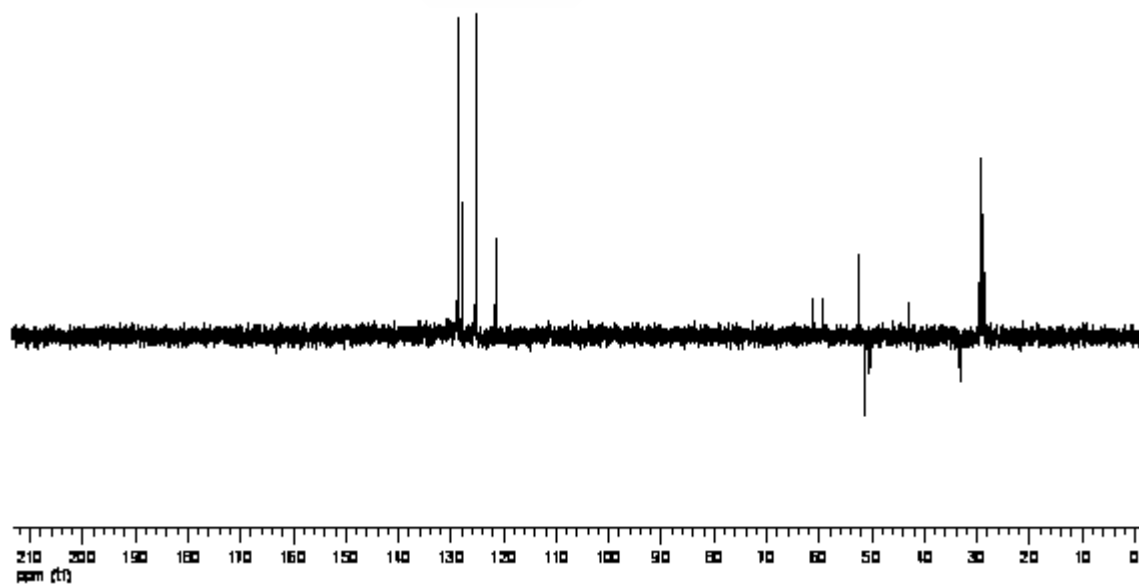
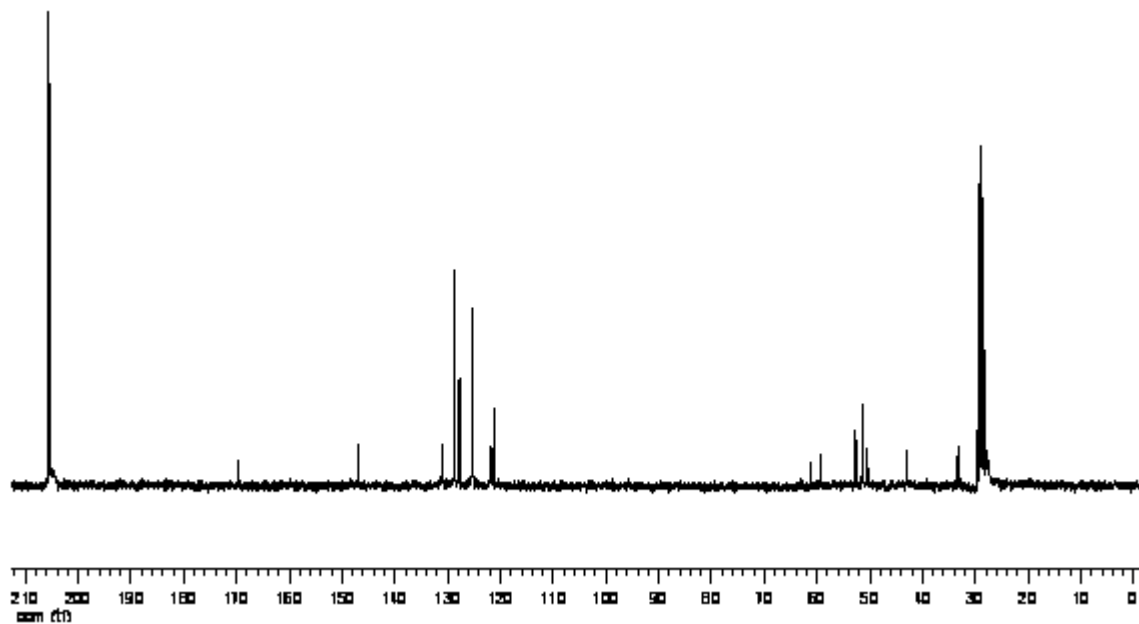
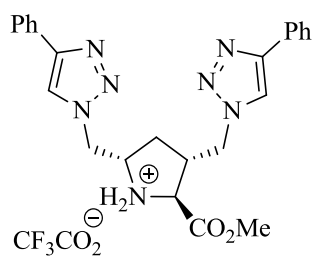
IR v (KBr) (cm^{-1}): 3296, 3009, 1737, 1617, 1588, 1381, 1205, 1159, 1054, 765.

^1H RMN (acetona- d_6) δ (ppm): 8,48 y 8,46 (2s, 2H, 5- $\text{H}_{\text{triazolil}}$ y 5'- $\text{H}_{\text{triazolil}}$), 7,91-7,86 (m, 4H, 2-H, 6-H, 2'-H y 6'- H_{fenil}), 7,46-7,41 (m, 4H, 3-H, 5-H, 3'-H y 5'- H_{fenil}), 7,35-7,31 (m, 2H, 4-H y 4'- H_{fenil}), 5,04-4,89 (m, 3H), 4,83-4,76 (m, 1H), 4,70-4,68 (m, 1H), 4,48-4,46 (m, 1H), 3,70 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,41-3,30 (m, 1H), 2,53-2,45 (m, 1H, 4- HH), 1,15 (dt, $J = 26,3, 7,04$ Hz, 1H, 4- HH).

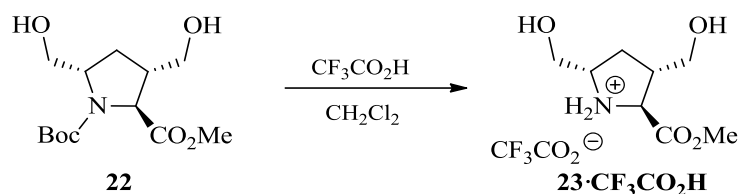
^{13}C RMN (TFA- d_1) δ (ppm): 169,76 (C), 146,97 (C), 146,93 (C), 131,14 (C), 130,96 (C), 128,70 (2 CH), 127,82 (CH), 127,74 (CH), 125,29 (CH), 125,41 (2 CH), 121,71 (C), 121,27 (CH), 61,20 (CH), 59,29 (CH), 52,65 (CH_3), 51,42 (CH_2), 50,46 (CH_2), 42,94 (CH), 33,26 (CH_2).

EM-IE m/z (%): 444 (M^+ , 1), 159 (22), 153 (6), 130 (28), 116 (70), 103 (50), 94 (44), 89 (15), 82 (63), 80 (100), 77 (57), 69 (8), 68 (41), 67 (46), 59 (21), 55 (7), 53 (19), 51 (8).





3.32.3. Trifluoroacetato de (±)-(2*R,3*R**,5*R**)-3,5-bis(hidroximetil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (23·CF₃CO₂H)**



Tiempo de reacción: 6 h. El residuo marrón obtenido fue purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyentes CH₂Cl₂/MeOH (20:1) y MeOH. De la fracción metanólica se aisló **23·CF₃CO₂H** (48%), como un aceite amarillo.

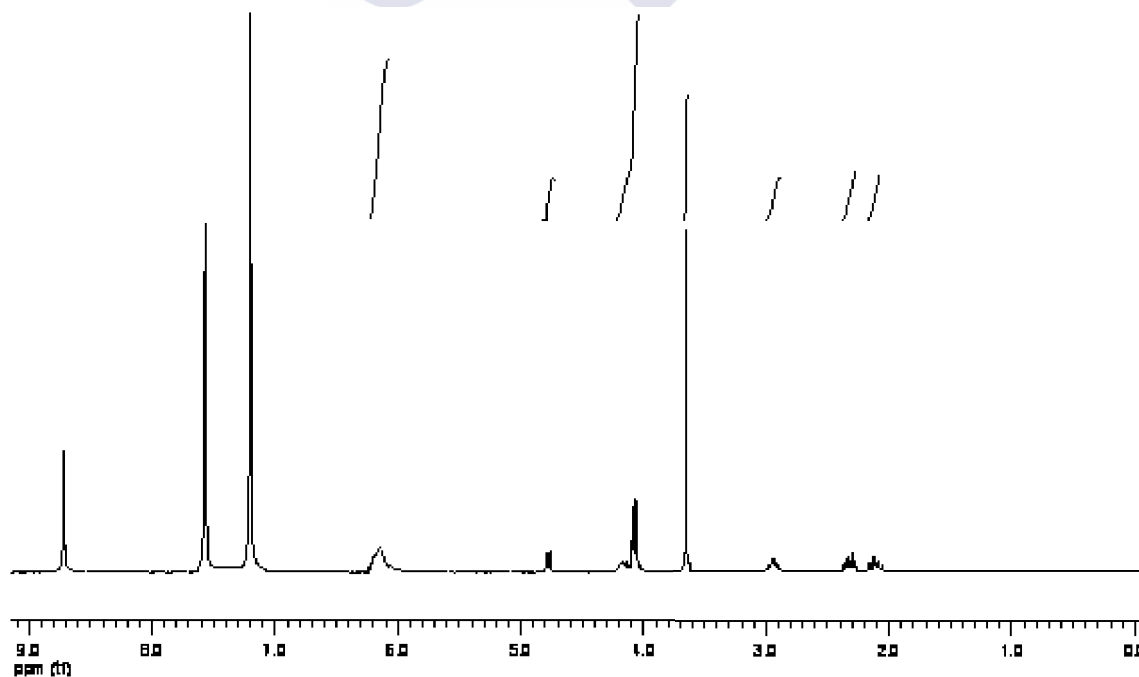
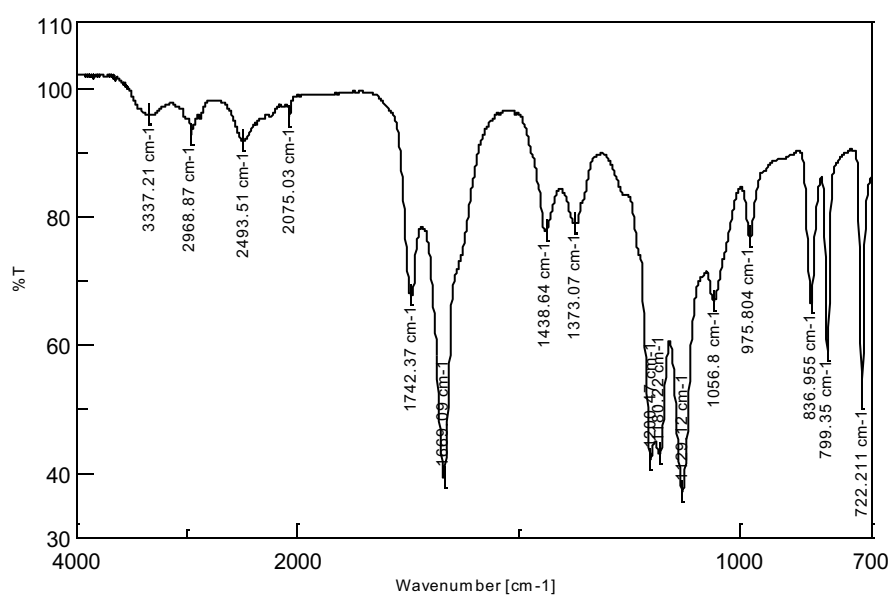
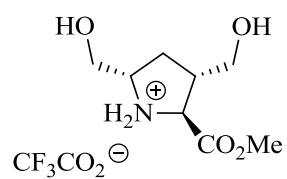
IR ν (cm⁻¹): 3337, 2969, 2493, 1742, 1669, 1439, 1373, 1200, 1180, 1129, 1057, 837, 799, 722.

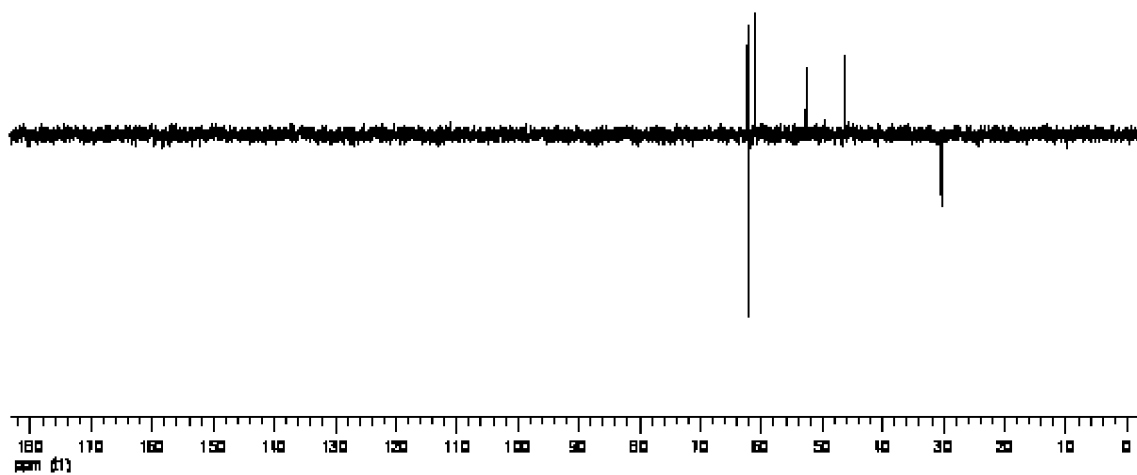
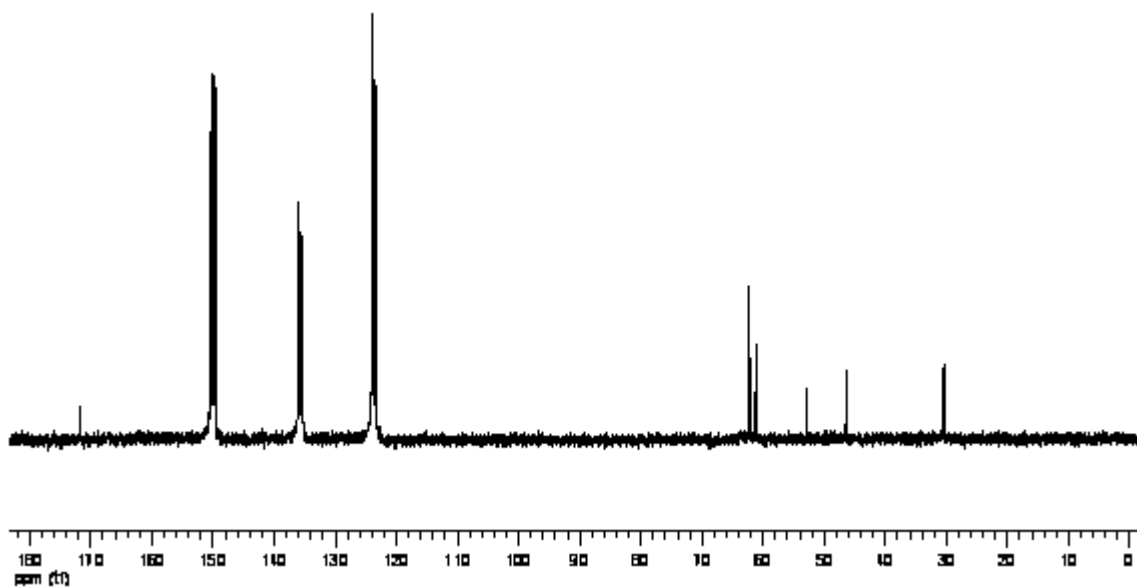
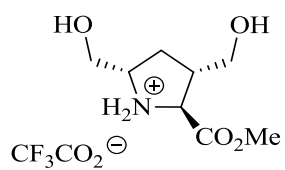
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 6,15 (s an, 4H, intercambian con D₂O, ⁺NH₂ y 2 OH), 4,78 (dd, *J* = 6,7, 2,6 Hz, 1H, 2-H), 4,19-4,03 (m, 5H, 5-H y 2 CH₂OH), 3,65 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,98-2,90 (m, 1H, 3-H), 2,32 (dt, *J* = 12,6, 7,3 Hz, 1H, 4-*HH*), 2,10 (dt, *J* = 12,6, 9,1 Hz, 1H, 4-*HH*).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 171,84 (C), 62,33 (CH), 62,22 (2 CH₂), 61,21 (CH), 52,79 (CH₃), 46,44 (CH), 30,43 (CH₂).

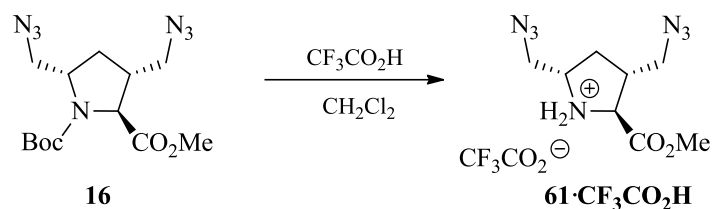
EM-IE *m/z* (%): 190 (M⁺, 11), 159 (35), 158 (60), 131 (14), 130 (100), 126 (10), 118 (10), 112 (21), 108 (11), 100 (70), 99 (11), 95 (11), 94 (12), 83 (49), 82 (14), 81 (69), 71 (18), 70 (93), 69 (84), 68 (30), 58 (18), 57 (34), 56 (43), 55 (18), 54 (17), 52 (41).

EM-AR *m/z*: calculado para C₈H₁₆NO₄, 190,1074; encontrado, 190,1093.





3.32.4. Trifluoroacetato de (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidometil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (61·CF₃CO₂H)**



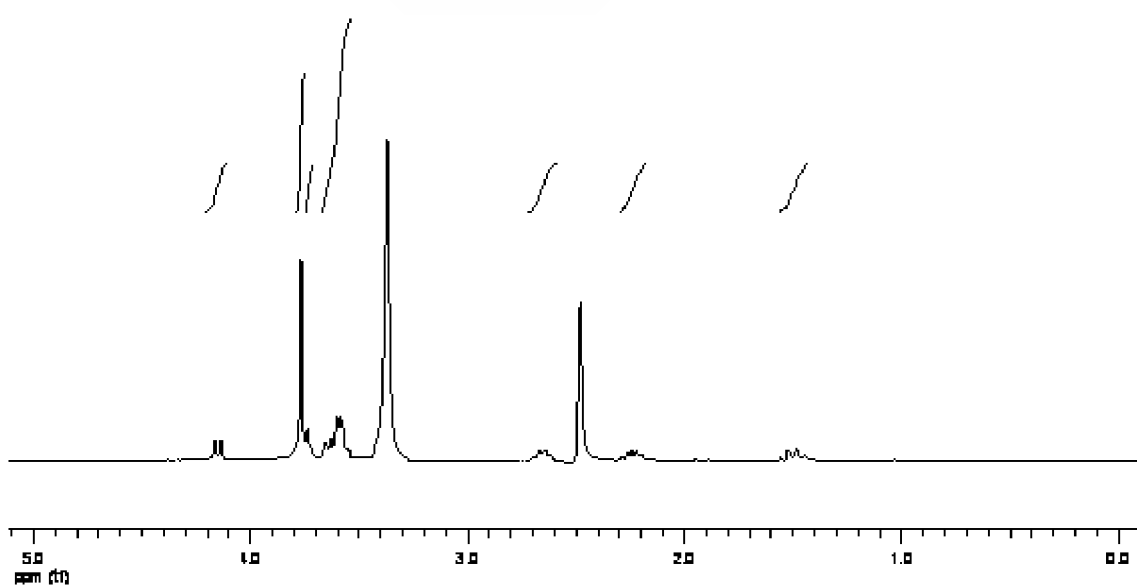
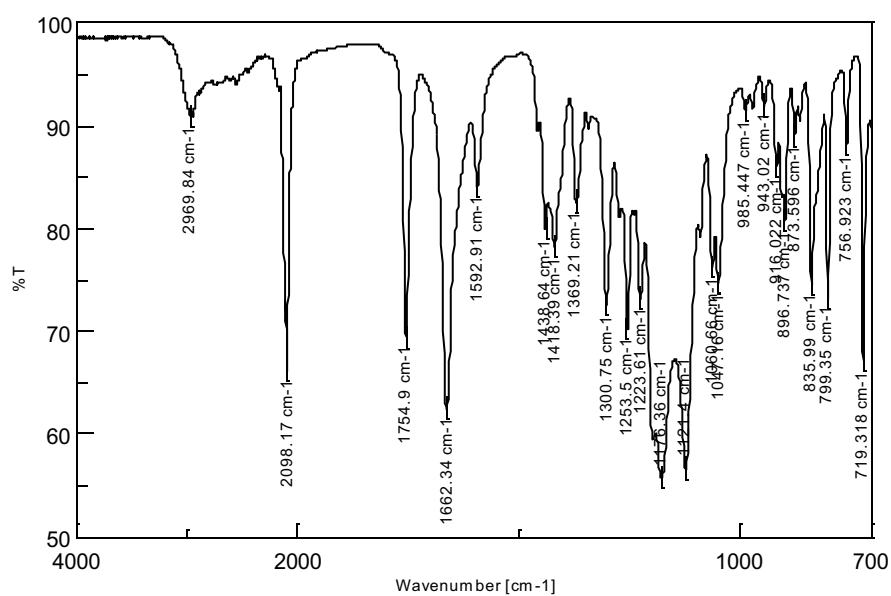
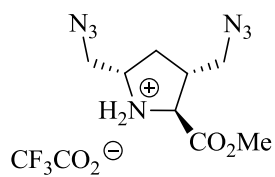
Tiempo de reacción: 2 h. El residuo marrón obtenido fue tratado con una mezcla de AcOEt/Et₂O, precipitando **61·CF₃CO₂H** (80%), como un sólido blanco, p.f. = 104–106 °C.

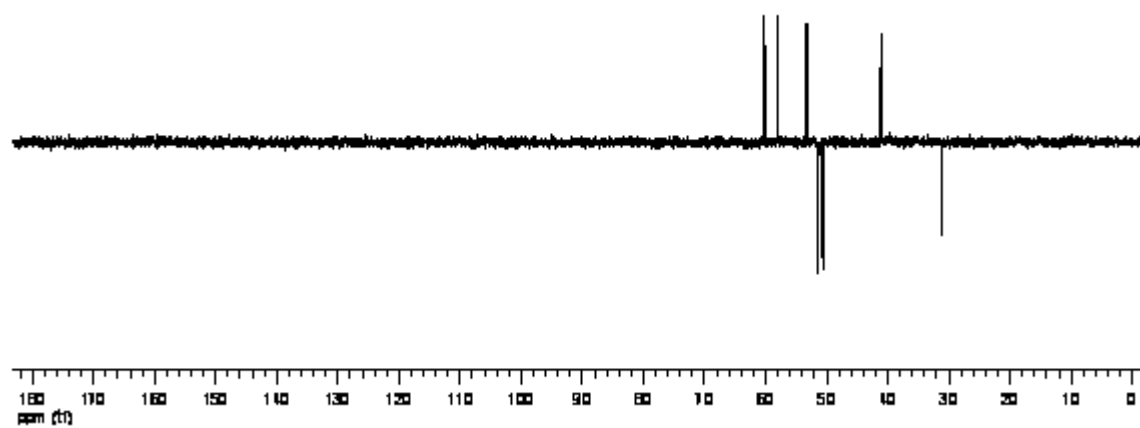
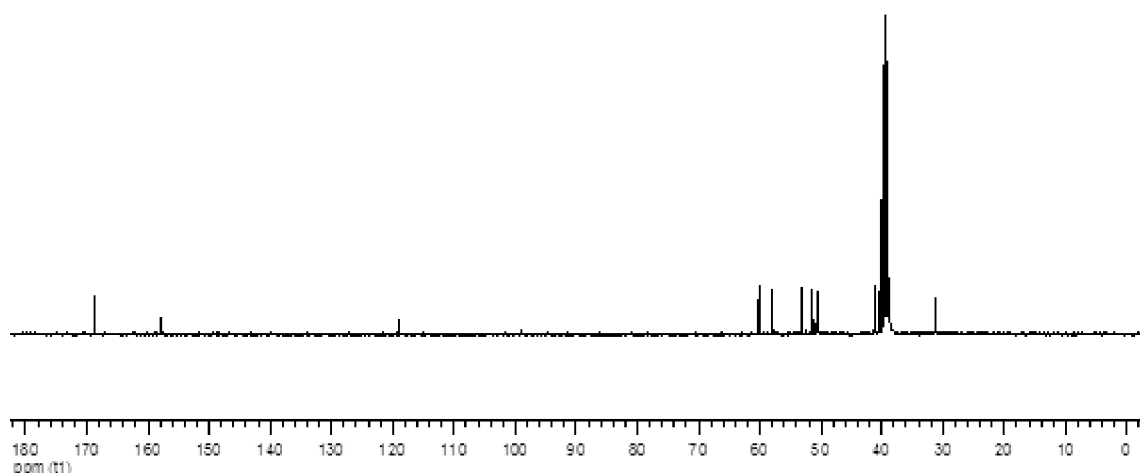
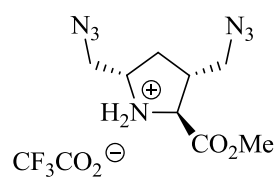
IR ν (cm⁻¹): 2970, 2098, 1754, 1662, 1418, 1301, 1253, 1176, 1121, 1047, 836, 799, 719.

¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4,14 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 2-H), 3,77 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,76-3,72 (m, 1H), 3,66-3,53 (m, 4H), 2,69-2,63 (m, 1H), 2,28-2,22 (m, 1H, 4-HH), 1,54 (dt, *J* = 12,9, 9,9 Hz, 1H, 4-HH).

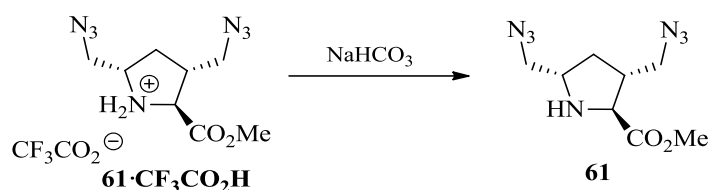
¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 168,62 (C), 158,00 (C), 119,08 (C), 60,17 (CH), 58,0 (CH), 53,25 (CH₃), 51,38 (CH₂), 50,67 (CH₂), 41,15 (CH), 31,24 (CH₂).

EM-IE *m/z* (%): 240 (M⁺, 1), 184 (11), 183 (100), 180 (38), 126 (33), 106 (9), 95 (17), 94 (12), 82 (16), 80 (25), 69 (35), 68 (19), 59 (12), 56 (8), 55 (7), 54 (7), 52 (11).





3.33. (±)-(2*R**,3*S**,5*R**)-3,5-Bis(azidometil)pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**61**)



El **61**· $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (0,25 g, 0,71 mmol) se agitó en una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (30 mL) a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a sequedad rindiendo **61** como un aceite amarillo claro (0,10 g, 62%).

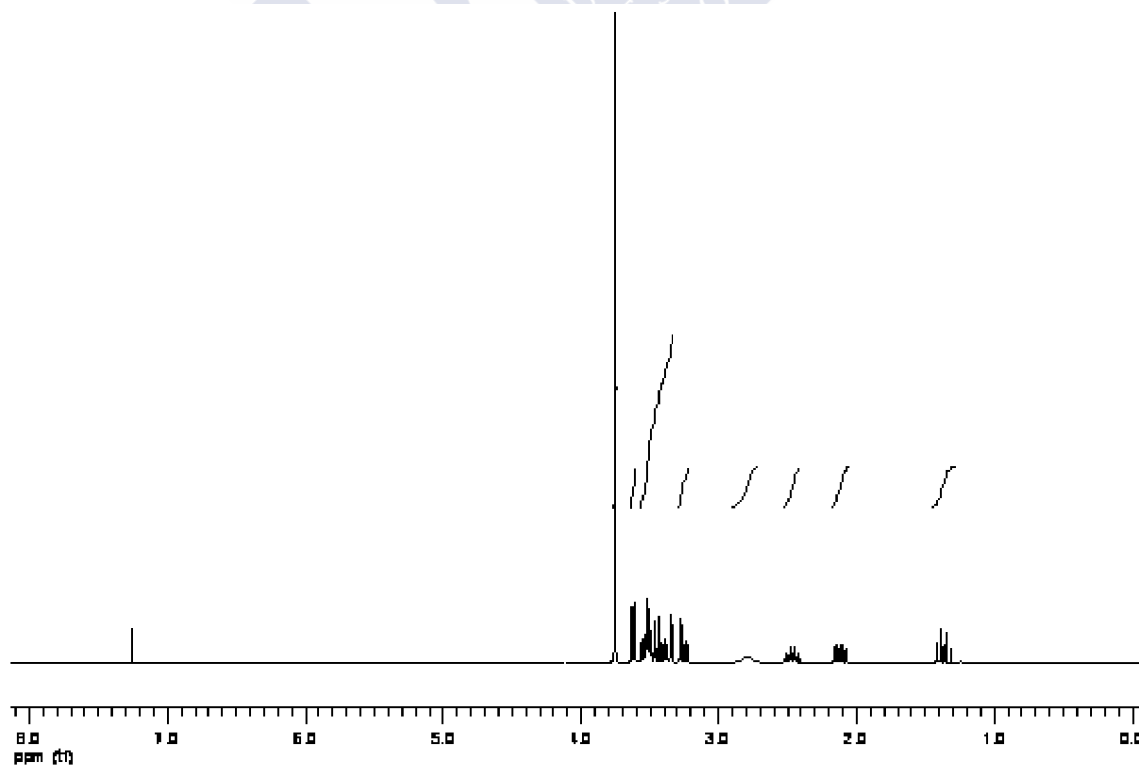
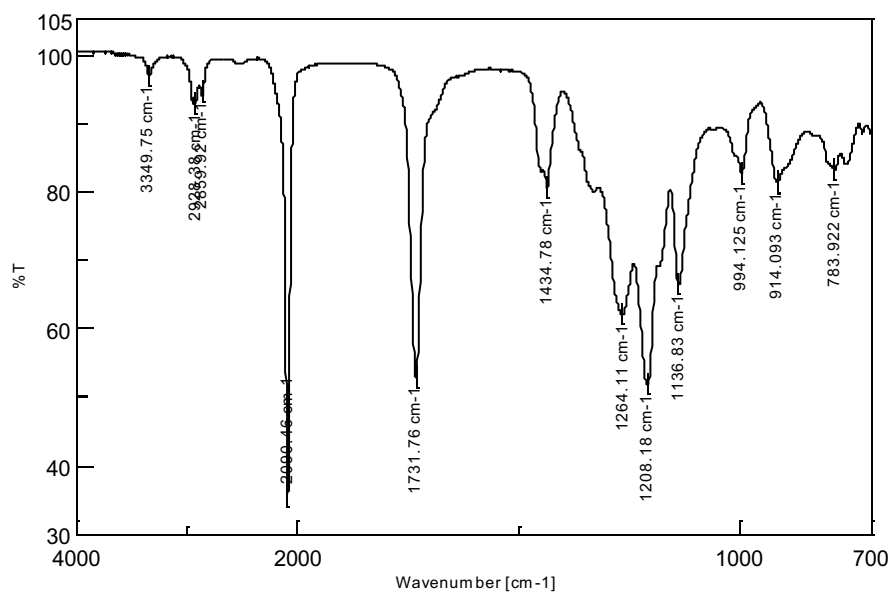
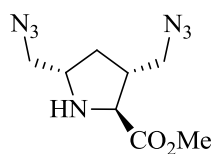
IR v (cm^{-1}): 2928, 2091, 1732, 1434, 1264, 1210, 1138, 912, 753.

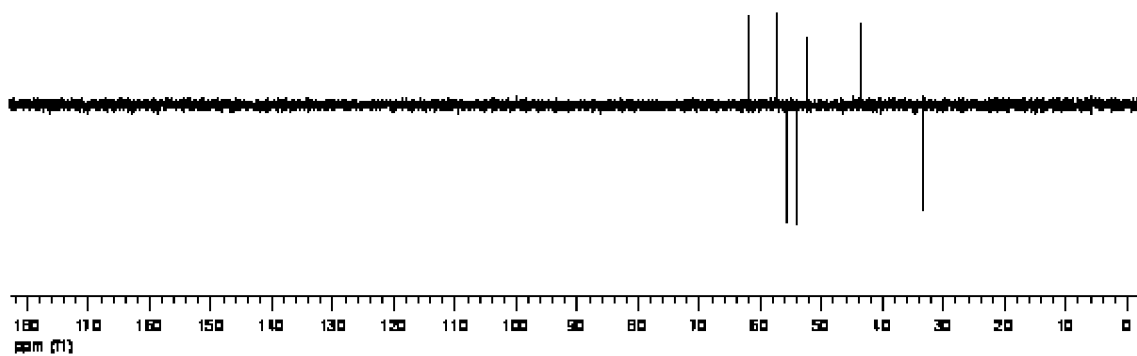
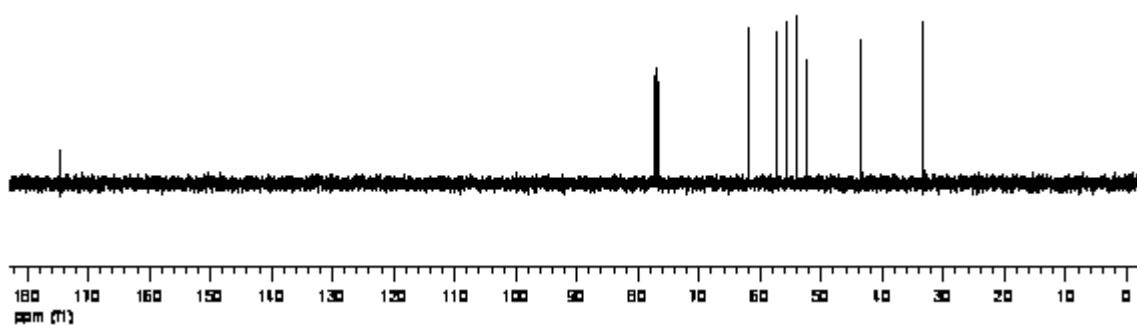
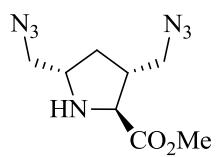
^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 3,75 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,62 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, 2-H), 3,33-3,60 (m, 4H), 3,25 (dd, $J = 12,1, 6,4$ Hz, 1H), 2,79 (s an, 1H, intercambia con D_2O , NH), 2,40-2,52 (m, 1H), 2,12 (ddd, $J = 12,7, 7,7, 6,6$ Hz, 1H, 4-HH), 1,37 (dt, $J = 12,7, 9,1$ Hz, 1H, 4-HH).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 174,52 (C), 61,99 (CH), 57,34 (CH), 55,74 (CH_2), 54,14 (CH_2), 52,43 (CH_3), 43,45 (CH), 33,29 (CH_2).

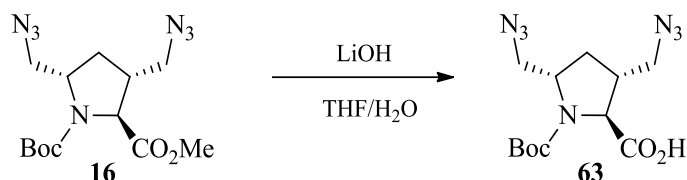
EM-IE m/z (%): 240 [$(\text{M}+1)^+$, 51], 197 (32), 183 (100), 126 (43), 118 (67), 80 (47), 68 (56), 59 (14), 57 (99).

EM-AR m/z : calculado para $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_7\text{O}_2$, 239,1131; encontrado, 239,1172.





3.34. Ácido (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxílico (63)**



Sobre una disolución de **16** (1,60 g, 4,71 mmol) en THF (6 mL) a 0 °C, se añadió LiOH (1,41 g, 58,87 mmol) disuelto en THF/H₂O (1/1) (53 mL) y la mezcla resultante se agitó durante 0,5 h a esa temperatura y después 65 h a temperatura ambiente. Tras eliminar el THF, el residuo en suspensión se disolvió añadiendo H₂O (20 mL) y la disolución acuosa resultante se llevó a pH 4–5 por adición de una disolución de H₂SO₄ 1 M; el residuo sólido blanco obtenido tras la eliminación del H₂O a sequedad, se extrajo en caliente con una mezcla de Et₂O/EtOH (1:3) (200 mL); la eliminación del disolvente de los extractos orgánicos reunidos condujo a **63** (1,45 g, 95%), como un sólido blanco, p.f. = 88–89 °C.

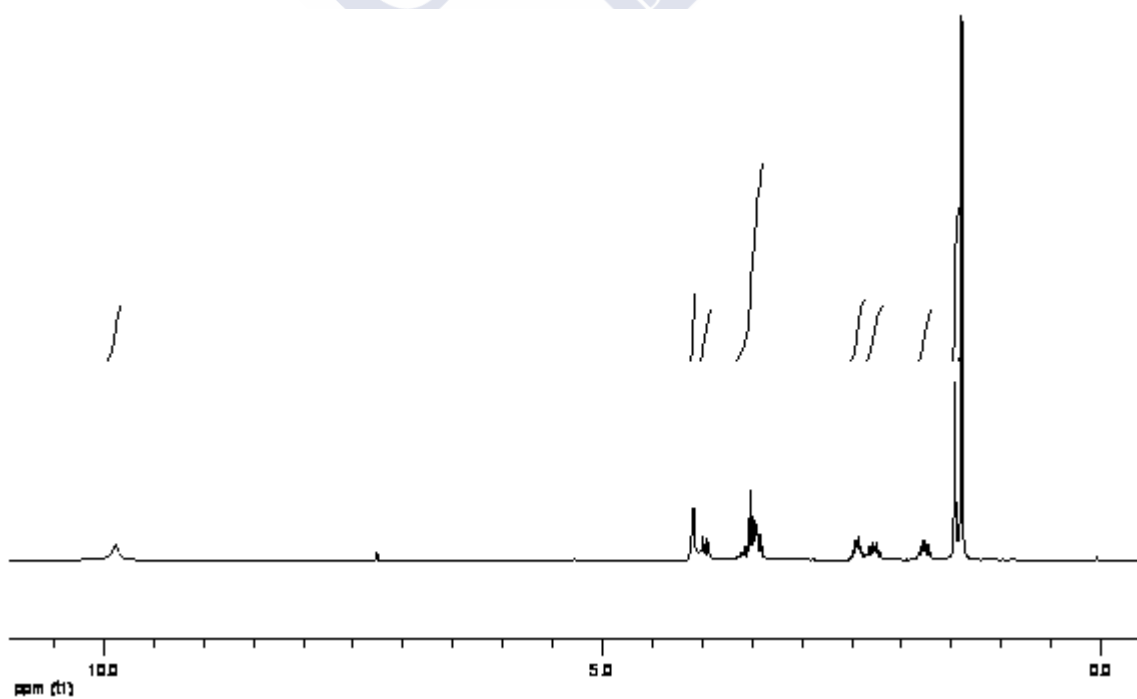
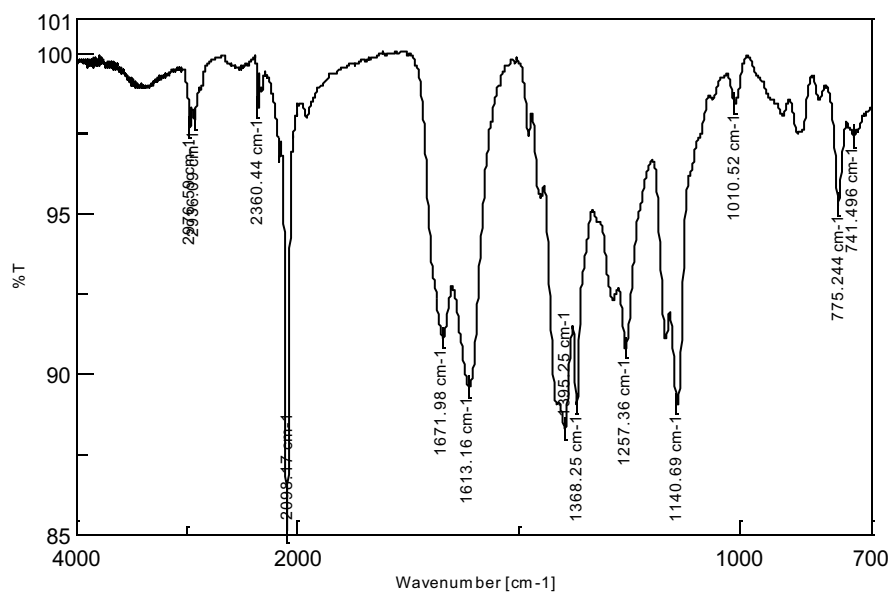
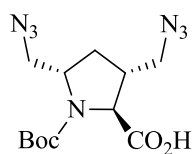
IR ν (cm⁻¹): 2977, 2936, 2098, 1672, 1613, 1395, 1368, 1257, 1141, 775.

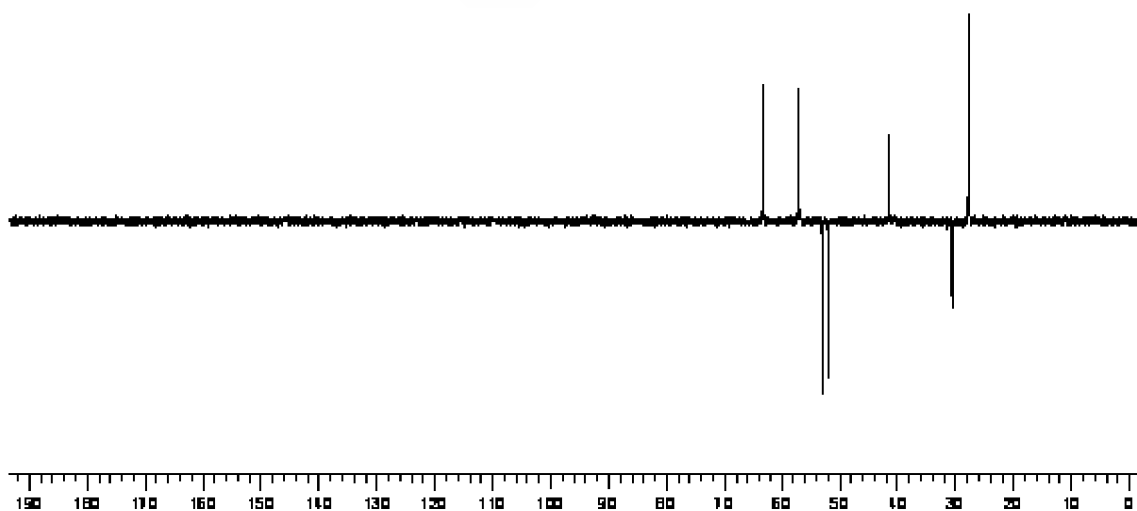
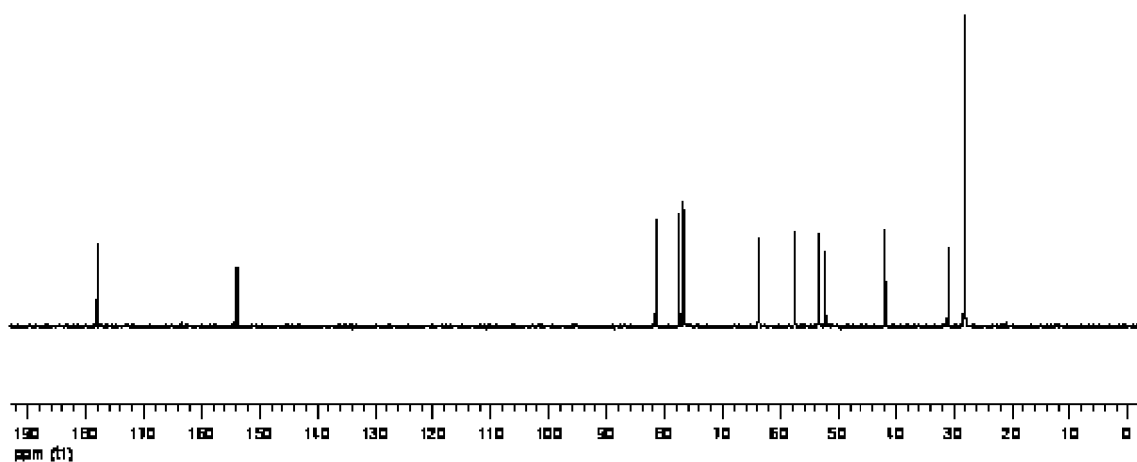
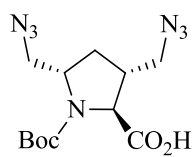
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 9,88 (s an, 1H, intercambia con D₂O, CO₂H), 4,09 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, 2-H), 3,96 (dd, *J* = 12,5, 5,2 Hz, 1H, 5-H), 3,65-3,41 (m, 4H), 2,50-2,39 (m, 1H), 2,36-2,22 (m, 1H), 1,80-1,71 (m, 1H, 4-HH), 1,46 (s, 3H, CH₃), 1,40 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 178,10 (C), 153,88 (C), 81,56 (C), 63,77 (CH), 57,56 (CH), 53,33 (CH₂), 52,23 (CH₂), 41,83 (CH), 31,02 (CH₂), 28,11 (3 CH₃).

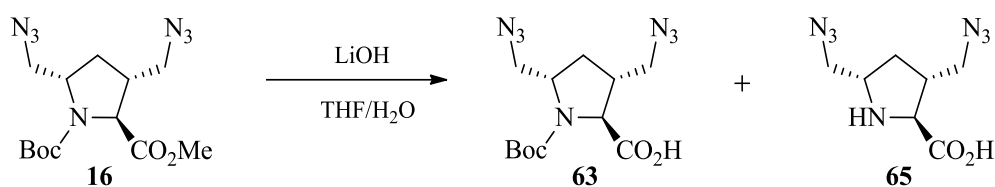
EM-IE *m/z* (%): 325 (M⁺, 1), 225 (7), 181 (2), 180 (21), 169 (16), 126 (4), 85 (4), 80 (4), 71 (5), 69 (7), 68 (9), 57 (43), 56 (100), 55 (37).

Microanálisis. Calculado para C₁₂H₁₉N₇O₄ (325,32): C 44,30, H 5,89, N 30,14. Encontrado: C 44,63, H 6,15, N, 29,87.





3.35. Ácido (±)-(2*R**,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidometil)pirrolidina-2-carboxílico (65)



En un ensayo realizado inicialmente en idénticas condiciones a las indicadas previamente (apartado 3.34), a partir de **16** (600 mg, 1,77 mmol), pero en el que en el proceso de elaboración se alcanzó un pH entre 3–4 por tratamiento con H₂SO₄ 1 M, de la primera extracción en caliente con EtOH/H₂O del residuo sólido obtenido (500 mg), se aisló **65** (30 mg, 7,5%) y de las siguientes **63** (410 mg, 71%) cuyas propiedades físicas y espectroscópicas fueron idénticas a las encontradas previamente (apartado 3.34).

Compuesto **65**: sólido blanco, p.f. = 185–187 °C.

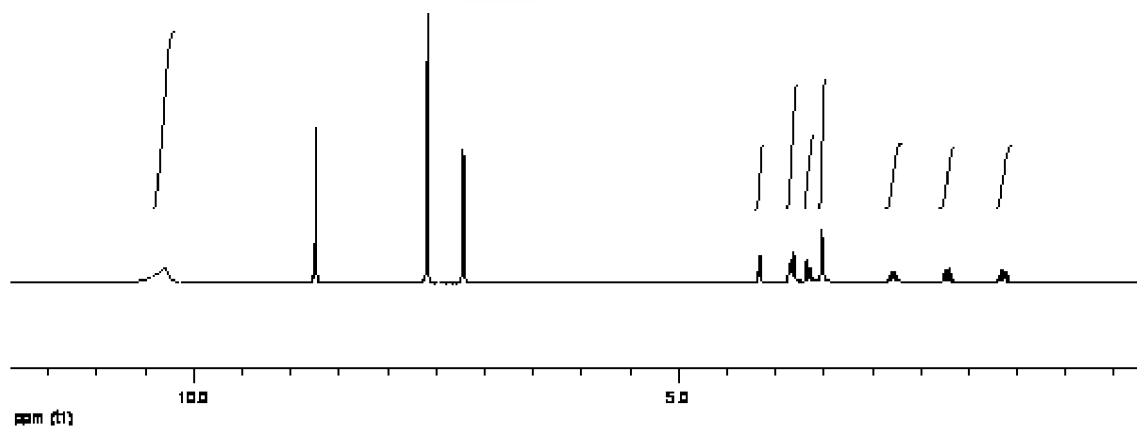
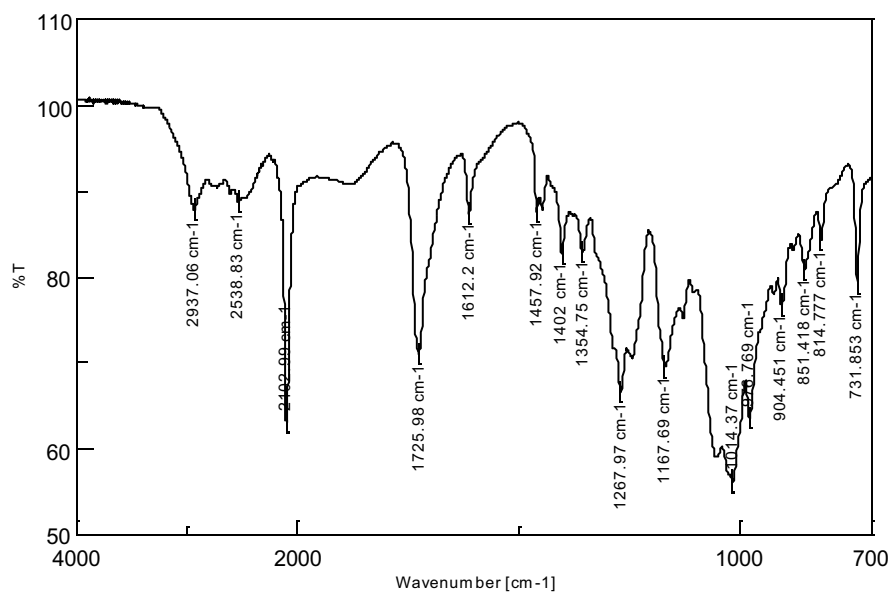
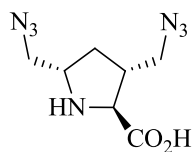
IR v (cm⁻¹): 2937, 2539, 2103, 1726, 1612, 1402, 1355, 1268, 1014, 977, 732.

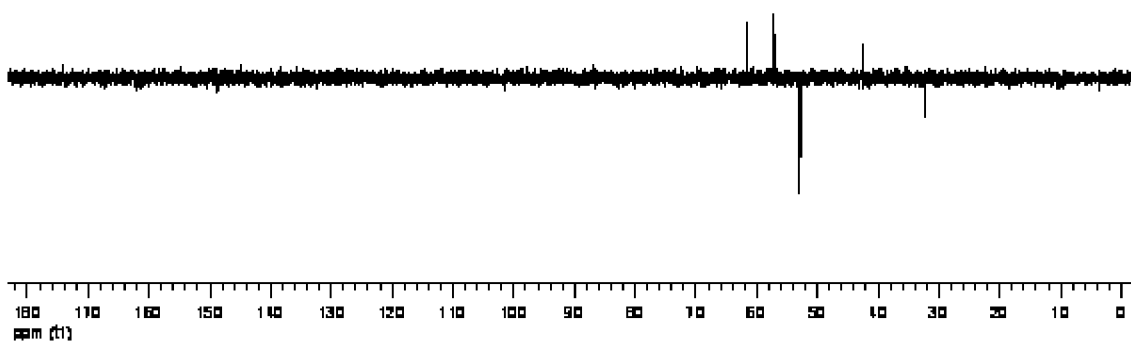
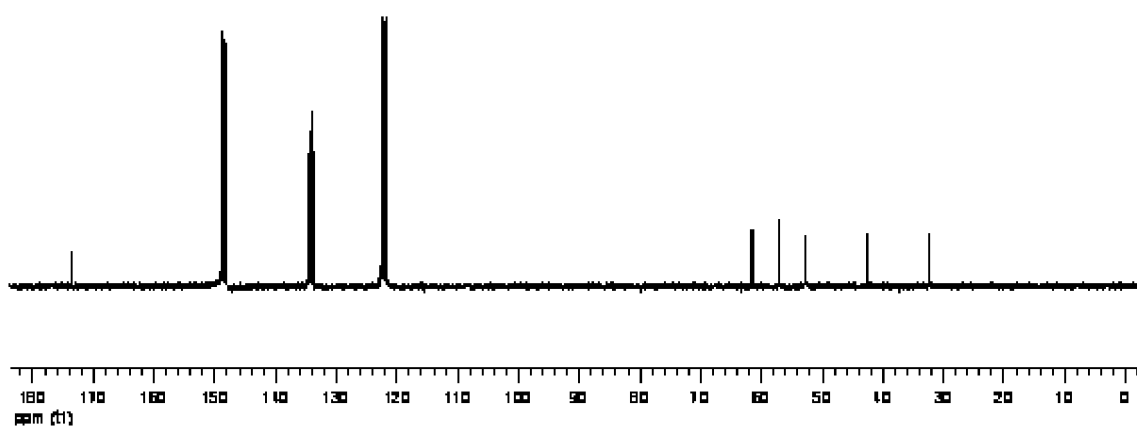
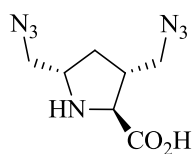
¹H RMN (piridina *d*₅) δ (ppm): 10,30 (s an, 2H, intercambian con D₂O, CO₂H y NH), 4,16 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, 2-H), 3,83 (dd, *J* = 12,2, 5,9 Hz, 2H), 3,66 (dd, *J* = 12,1, 7,4 Hz, 1H), 3,52-3,50 (m, 2H), 2,82-2,75 (m, 1H), 2,22 (dt, *J* = 12,4, 7,2 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,64 (dt, *J* = 12,4, 9,5 Hz, 1H, 4-*HH*).

¹³C RMN (piridina *d*₅) δ (ppm): 173,57 (C), 61,54 (CH), 57,18 (CH), 52,89 (2 CH₂), 42,54 (CH), 32,37 (CH₂).

EM-IE *m/z* (%): 225 (M⁺, 1), 180 (3), 141 (7), 127 (12), 126 (4), 118 (20), 113 (15), 111 (7), 110 (20), 99 (20), 97 (15), 85 (50), 84 (11), 83 (25), 71 (71), 70 (16), 69 (44), 57 (100), 56 (15), 55 (36).

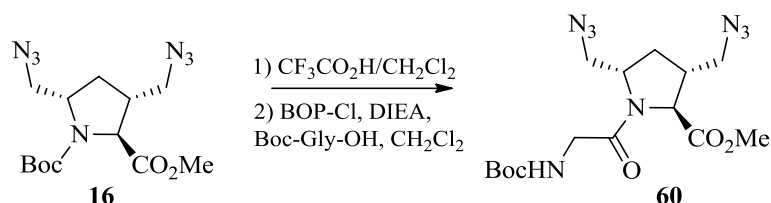
Microanálisis. Calculado para C₇H₁₁N₇O₂ (225,21): C 37,33, H 4,92, N 43,54. Encontrado: C 37,61, H 4,82, N, 43,79.





3.36. (±)-(2*R**,3*S**,5*R**)-3,5-Bis(azidometil)-1-[2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]acetil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**60**)

3.36.1. Método A



Sobre una suspensión agitada de **16** (200 mg, 0,59 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) enfriada mediante un baño de hielo y bajo atmósfera de argón, se añadió CF₃CO₂H (0,5 mL). La disolución resultante se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Tras la eliminación de los disolventes bajo presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en CH₂Cl₂ (8 mL) y DIEA (0,34 mL, 1,94 mmol), y se le añadió Boc-Gly-OH (124 mg, 0,71 mmol) y BOP-Cl (150 mg, 0,59 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 17 h, tras las cuales el CH₂Cl₂ se eliminó a vacío y el residuo resultante se disolvió en AcOEt (30 mL), la fase orgánica se lavó sucesivamente con una disolución HCl 2M (2 × 20 mL), una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 × 20 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. La eliminación del disolvente a presión reducida proporcionó un aceite amarillo claro (90 mg) que se fraccionó mediante dos cromatografías en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente en la primera una mezcla de hexano/AcOEt (2:1), y en la segunda una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (20:0,1), tras la eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto, se aisló **60** (15 mg, 6,5%) como un aceite incoloro.

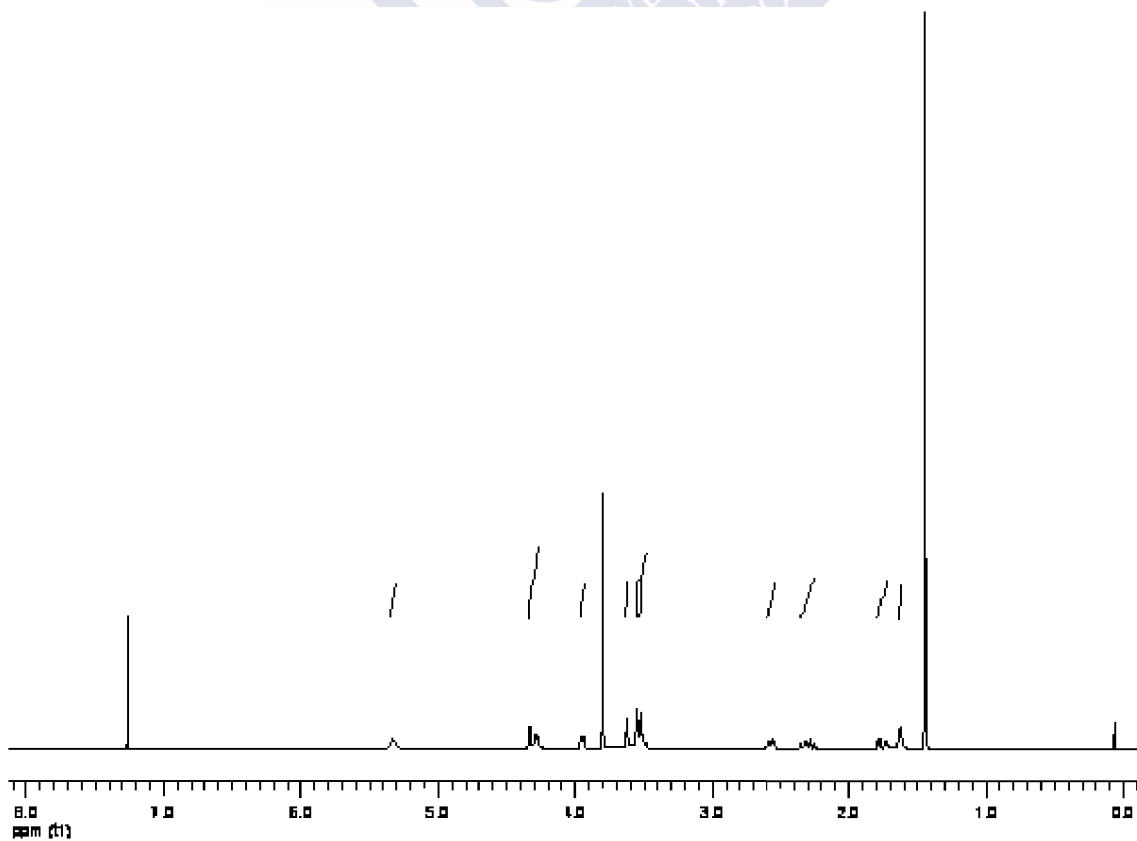
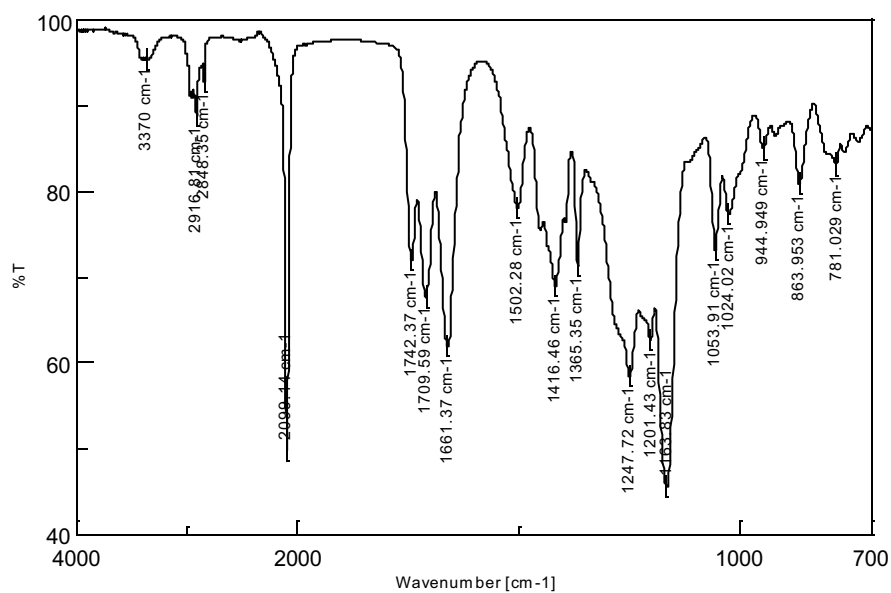
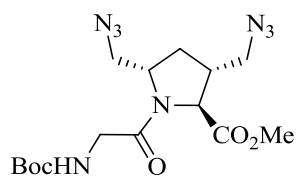
IR ν (cm⁻¹): 2917, 2099, 1742, 1709, 1661, 1502, 1416, 1365, 1248, 1164, 1054, 864.

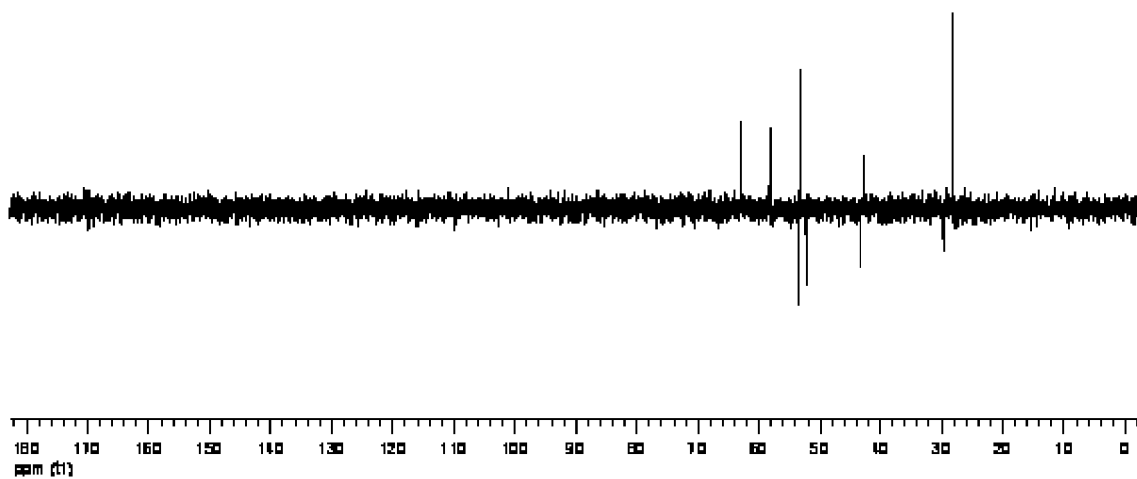
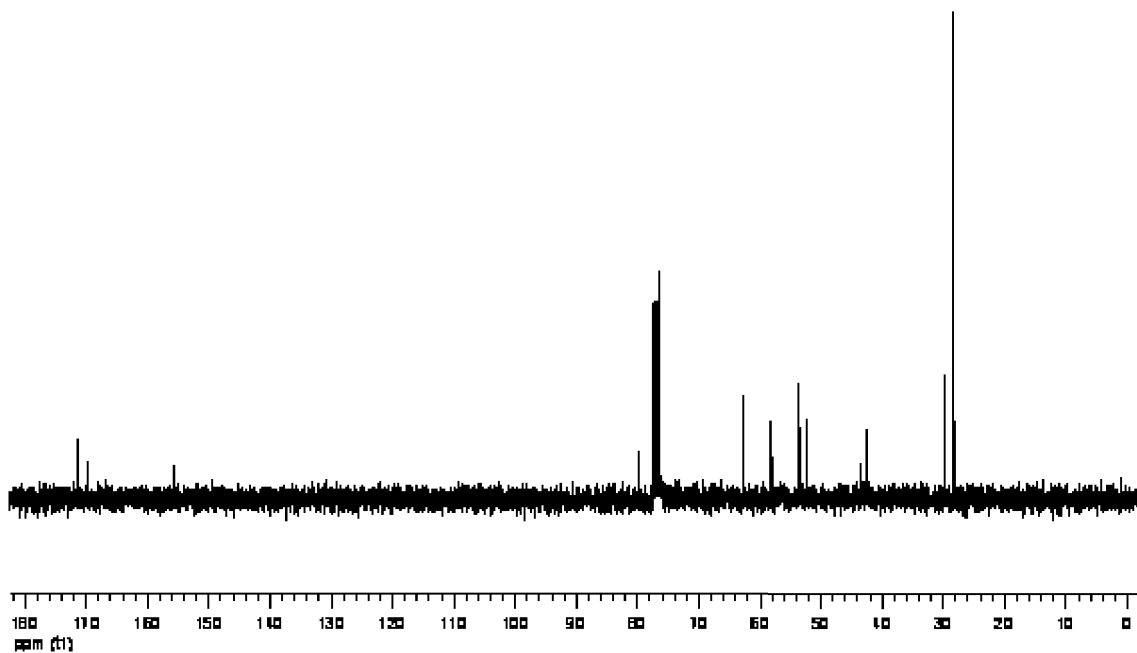
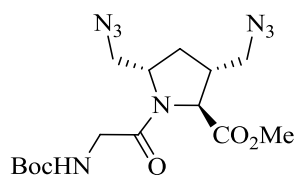
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 5,35-5,30 (m, 1H, 2-H), 4,33-4,26 (m, 2H), 3,95-3,93 (m, 1H), 3,80 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,64-3,62 (m, 1H), 3,56-3,54 (m, 1H), 3,53-3,48 (m, 2H), 2,58-2,54 (m, 1H), 2,30 (dt, *J* = 14,0, 9,1 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,75 (dt, *J* = 14,0, 3,4 Hz, 1H, 4-*HH*), 1,63-1,61 (m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 1,44 (s, 9H, 3 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 171,37 (C), 169,79 (C), 155,60 (C), 80,03 (C), 62,91 (CH), 58,06 (CH), 53,51 (CH₂), 53,22 (CH₃), 52,29 (CH₂), 43,40 (CH₂), 42,63 (CH), 29,68 (CH₂), 28,29 (3 CH₃).

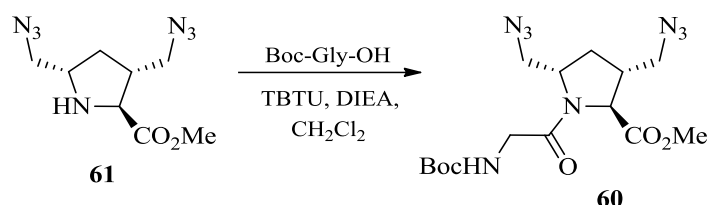
EM-BAR *m/z* (%): 398 [(*M* + 2)⁺, 7], 397 [(*M* + 1)⁺, 39], 341 [(*M* + 2)⁺ - CO₂CH₃, 45], 297 (18), 231 (54), 155 (21), 154 (100), 137 (78).

EM-AR *m/z*: calculado para C₁₅H₂₅N₈O₅, 397,1948; encontrado, 397,1962 [*MH*]⁺.



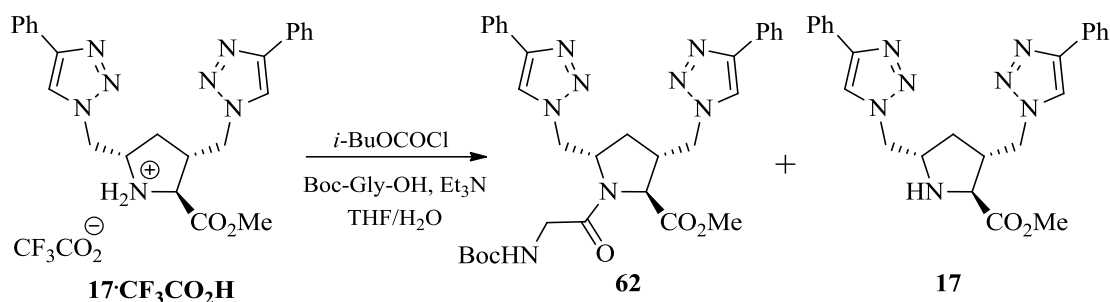


3.36.2. Método B



Sobre una disolución de Boc-Gly-OH (79 mg, 0,45 mmol), TBTU (193 mg, 0,6 mmol) y DIEA (0,26 mL, 1,50 mmol) en CH₂Cl₂ (6 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón se añadió una disolución de **61** (90 mg, 0,38 mmol) en CH₂Cl₂ (6 mL) y la mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 63 h. Tras eliminación del disolvente a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en AcOEt (30 mL) y la disolución fue lavada sucesivamente con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 × 20 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL); la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a sequedad y el residuo aceitoso obtenido (130 mg) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como mezcla eluyente hexano/AcOEt (3:1). La eliminación a vacío del disolvente de las primeras fracciones que contenían producto, permitió recuperar **61** (43 mg) y de un segundo grupo de fracciones se aisló **60** (18 mg, 12%) como una aceite incoloro cuyas datos físicos y espectroscópicos resultaron idénticos a los del compuesto obtenido por el *Método A*.

3.37. (\pm)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-[2-(*tert*-Butoxicarbonil)amino]acetil]-3,5-bis[(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**62**) y (\pm)-(2*R**,3*S**,5*R**)-3,5-bis-[(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil]pirrolidina-2-carboxilato de metilo (**17**)**



Sobre una disolución de Boc-Gly-OH (47,3 mg, 0,27 mmol) y Et₃N (0,032 mL, 0,23 mmol) en THF (2,4 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón, se añadió *i*-BuOCOC1 (0,03 mL, 0,22 mmol) y la suspensión resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió una disolución de **17**·CF₃CO₂H (100 mg, 0,22 mmol) y Et₃N (0,032 mL, 0,23 mmol) en H₂O (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que no se observó la presencia de material de partida (CCF, eluyente hexano/acetona (1:1)), 20 h. La disolución resultante se aciduló con HCl 2*N*, precipitando un sólido blanco **17** (20 mg, 25%), que se aisló por filtración. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 × 10 mL), y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a sequedad; el sólido amarillo claro obtenido (62 mg) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando eluyente hexano/AcOEt (2:1,2) y tras la eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto, se aisló **62** (14 mg, 13%).

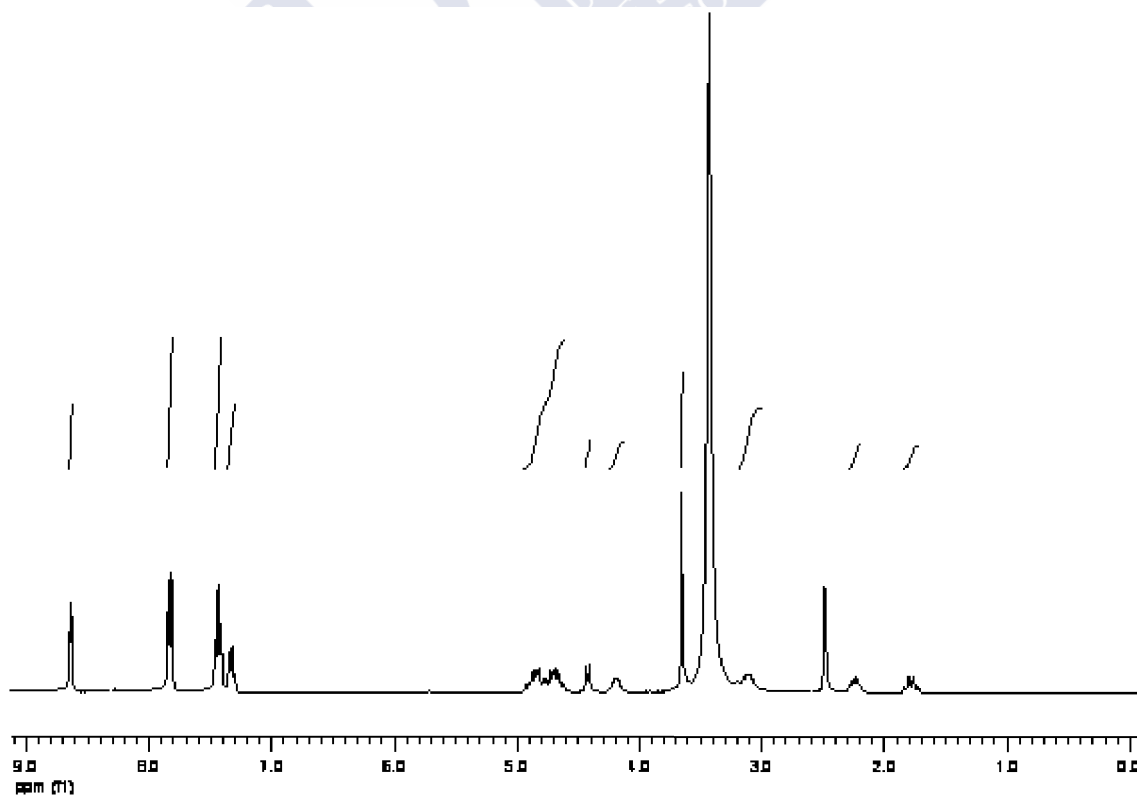
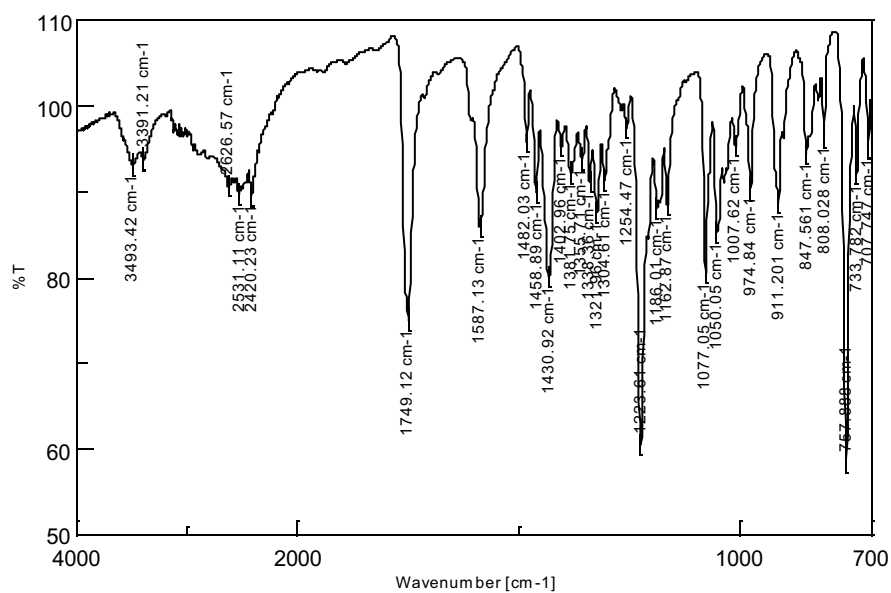
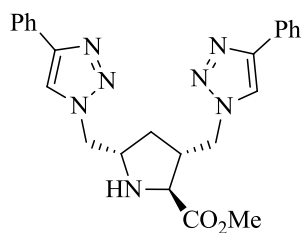
Compuesto **17**: sólido blanco, p.f. = 151–153 °C.

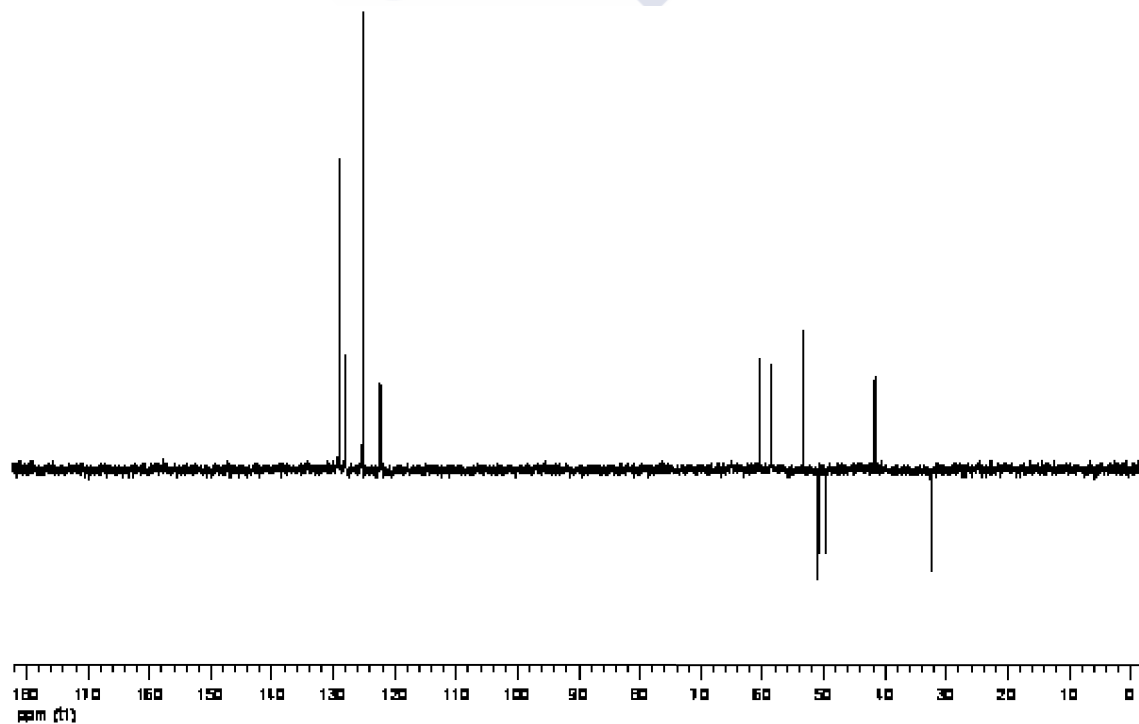
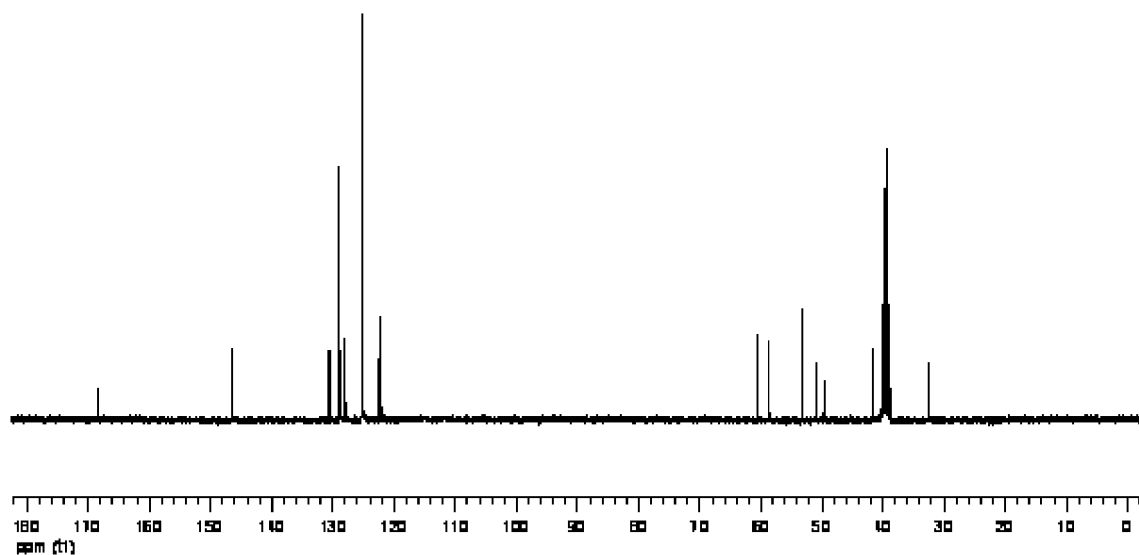
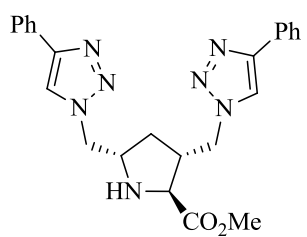
IR v (cm⁻¹): 3493, 2420, 1749, 1587, 1431, 1224, 1077, 1186, 1163, 759.

¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8,64 y 8,63 (2s, 2H, 5-H_{triazolilo} y 5'-H_{triazolilo}), 7,83 (d, *J* = 7,4 Hz, 4H, 2-H, 6-H, 2'-H y 6'-H_{fenilo}), 7,46-7,41 (m, 4H, 3-H, 5-H, 3'-H y 5'-H_{fenilo}), 7,35-7,30 (m, 2H, 4-H y 4'-H_{fenilo}), 4,91-4,67 (m, 4H), 4,42 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,22-4,17 (m, 1H), 3,65 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,19-3,07 (m, 2H, uno de ellos intercambia con D₂O, NH), 2,28-2,20 (m, 1H, 4-HH), 1,84-1,71 (m, 1H, 4-HH).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 168,36 (C), 146,48 (C), 146,46 (C), 130,64 (C), 130,50 (C), 128,99 (2 CH), 128,96 (2 CH), 128,07 (CH), 127,99 (CH), 125,22 (4 CH), 122,38 (C), 122,10 (CH), 60,55 (CH), 58,56 (CH), 53,23 (CH₃), 50,84 (CH₂), 49,61 (CH₂), 41,68 (CH), 32,47 (CH₂).

EM-BAR *m/z* (%): 443 (M⁺, 40), 285 (32), 273 (100), 231 (22), 145 (30), 116 (23), 80 (21).





Compuesto **62**: sólido blanco, p.f. = 196–199 °C.

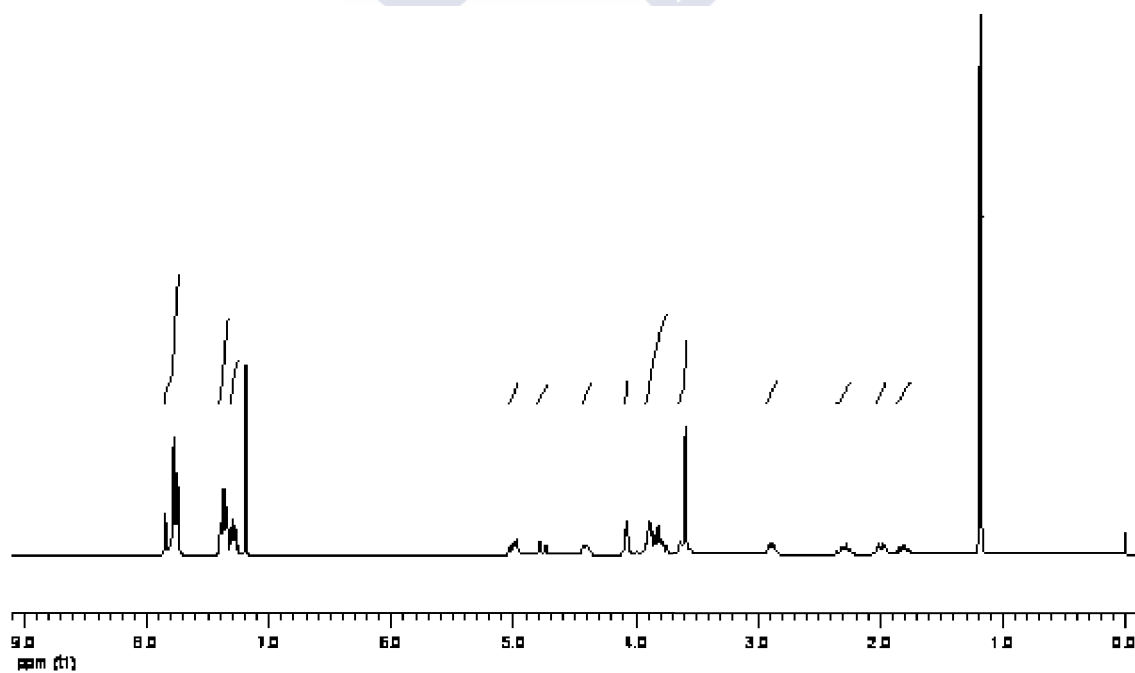
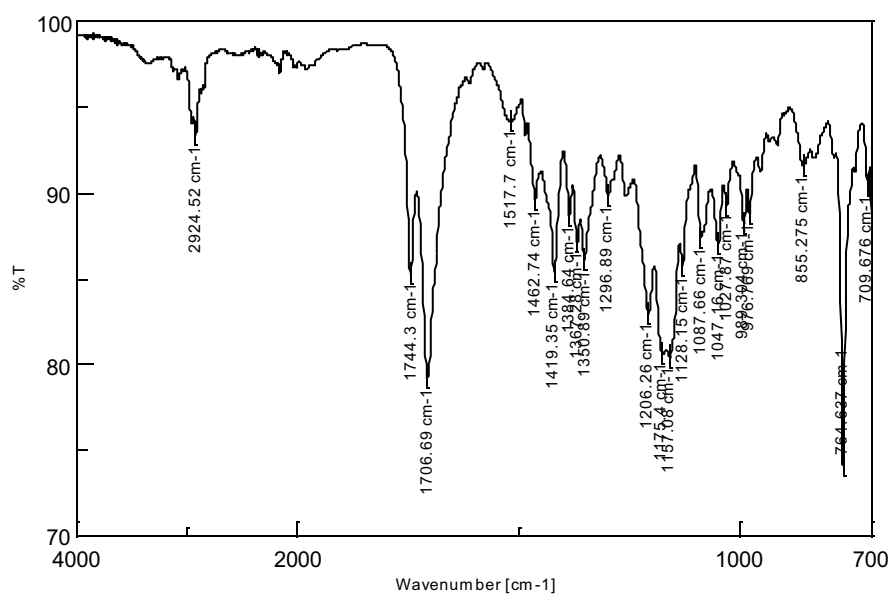
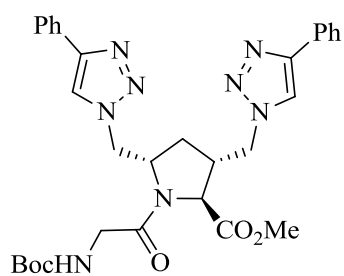
IR ν (cm^{-1}): 2925, 1744, 1707, 1419, 1351, 1206, 1175, 1157, 765.

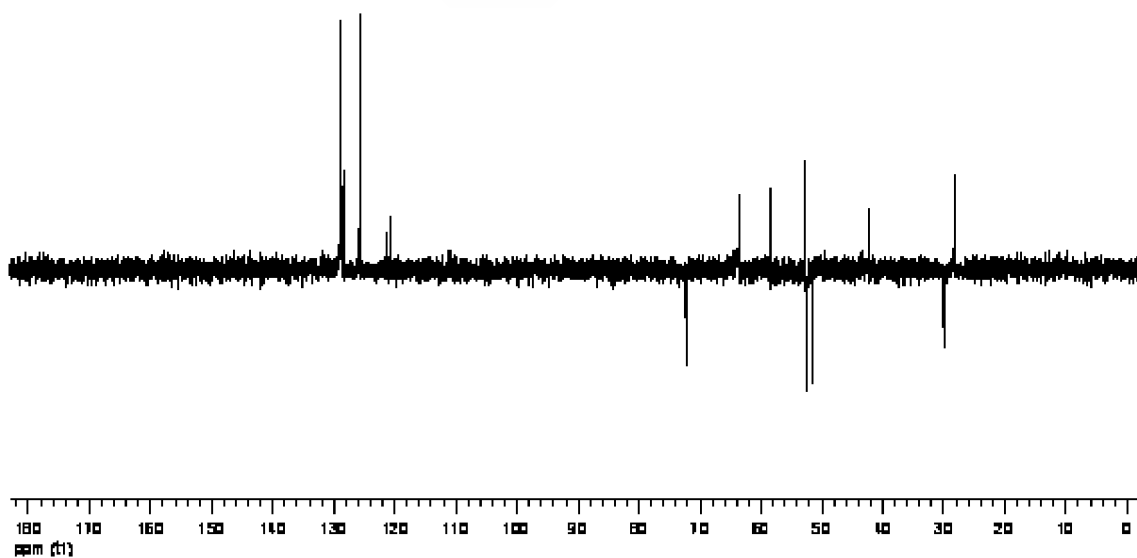
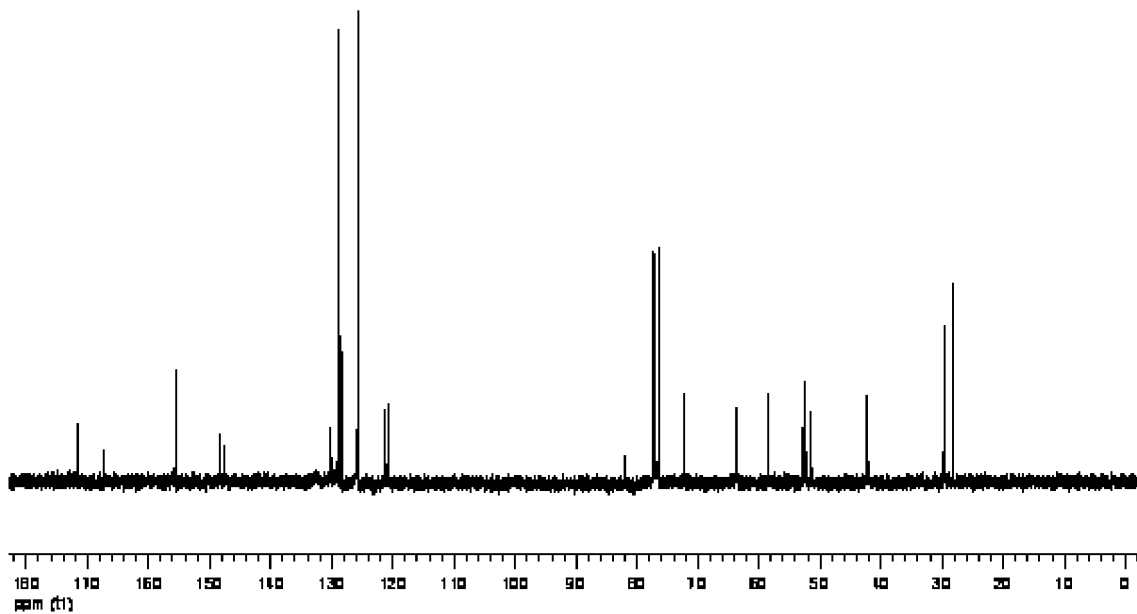
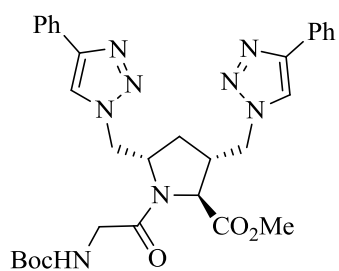
^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 7,92 (s, 1H), 7,85-7,82 (m, 5H), 7,47-7,41 (m, 4H), 7,38-7,34 (m, 2H), 5,11-5,05 (m, 1H), 4,86-4,81 (m, 1H), 4,51-4,46 (m, 1H), 4,18-4,12 (m, 1H), 3,99-3,82 (m, 4H), 3,70-3,66 (m, 3H, CO_2CH_3), 2,99-2,92 (m, 1H), 2,44 (dt, $J = 14,3, 8,9$ Hz, 1H), 2,10-2,02 (m, 1H), 2,0-1,93 (m, 1H), 1,33 (s, 9H, 3 CH_3).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 171,70 (C), 167,27 (C), 155,63 (C), 148,18 (C), 147,78 (C), 130,25 (C), 130,11 (C), 128,98 (2 CH), 128,87 (2 CH), 128,46 (CH), 128,29 (CH), 125,79 (2 CH), 125,75 (2 CH), 121,26 (CH), 120,74 (CH), 81,91 (C), 72,30 (CH_2), 63,68 (CH), 58,40 (CH), 52,67 (CH_3), 52,38 (CH_2), 51,42 (CH_2), 42,22 (CH), 29,68 (CH_2), 28,28 (3 CH_3).

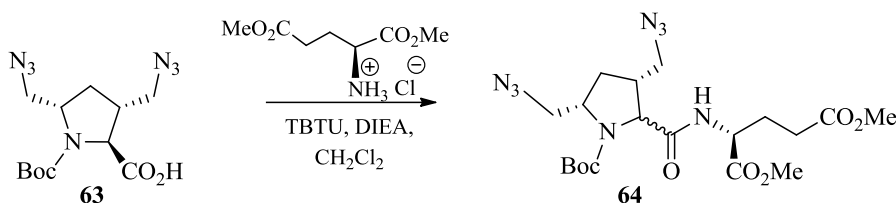
EM-IE m/z (%): 545 $[(M + 2)^+ - t\text{-Bu}, 7]$, 544 $[(M + 1)^+ - t\text{-Bu}, 42]$, 543 $[(M^+ - t\text{-Bu}, 100]$, 516 (11), 515 (36), 457 (15), 456 (48), 399 (59), 343 (50), 240 (18), 239 (17), 182 (15), 159 (20), 146 (14), 145 (23), 140 (28), 94 (61), 91 (18), 89 (19), 82 (30), 80 (39), 77 (23), 68 (14), 67 (25), 59 (11), 57 (95), 56 (10).

Microanálisis. Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_5$ (600.67): C 61.99, H 6.04, N 18.65. Encontrado: C 62.32, H 6.24, N 18.47.





3.38. (2S)-2-[[[(2R*,3S*,5R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidina-2-carbonil]amino]pentanodiato de dimetilo (mezcla de los diastereoisómeros 64a y 64b).



Sobre una disolución de **63** (0,32 g, 0,98 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón se añadió TBTU (0,50 g, 1,57 mmol) y la suspensión resultante se agitó a 0 °C durante 30 min. A continuación se añadieron clorhidrato de L-glutamato de dimetilo (0,25g, 1,18 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) y DIEA (0,68 ml, 3,93 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 0 °C y a temperatura ambiente hasta que no se observó la presencia de material de partida (CCF), 16 h. Tras la eliminación del disolvente a presión reducida el residuo se disolvió en AcOEt (50 mL) y la disolución se lavó sucesivamente con disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 × 25 mL) y disolución acuosa saturada de NaCl (25 mL), la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a sequedad. El residuo aceitoso obtenido (0,54 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como mezcla eluyente hexano/AcOEt (2:1) y tras la eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto, se aisló **64** (0,42 g, 90%) como un sólido blanco, p.f. = 58–60 °C.

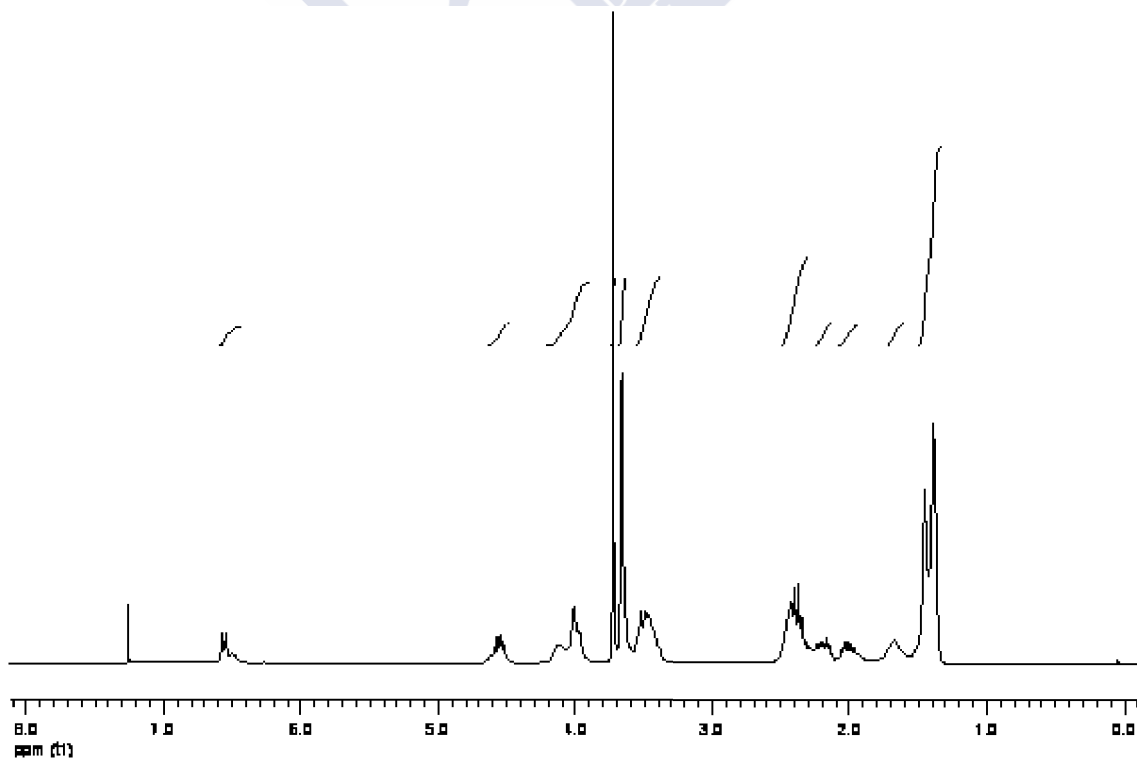
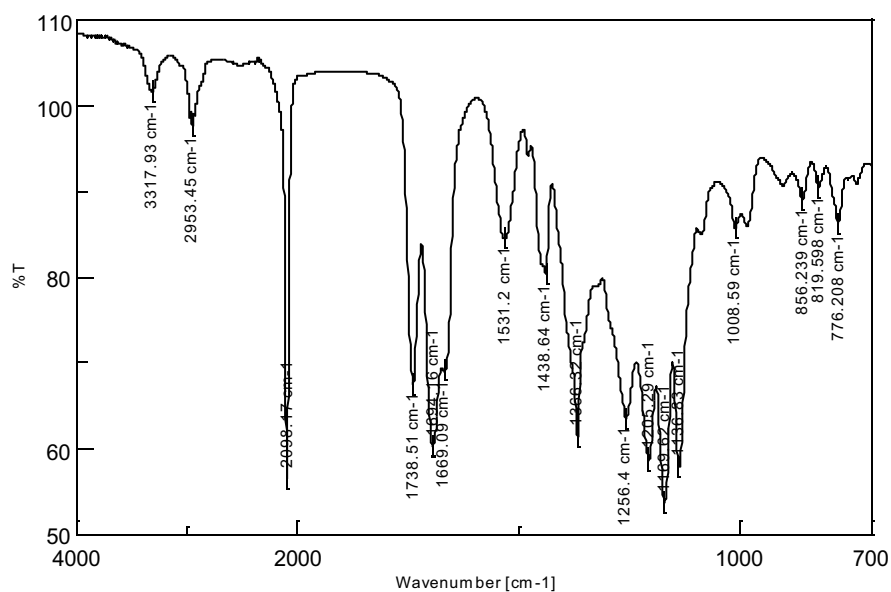
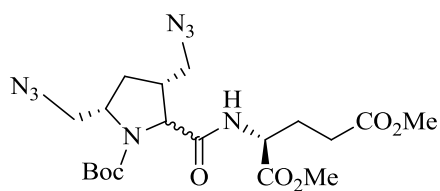
IR ν (cm⁻¹): 3318, 2953, 2098, 1738, 1694, 1669, 1531, 1439, 1366, 1205, 1170, 1137, 776.

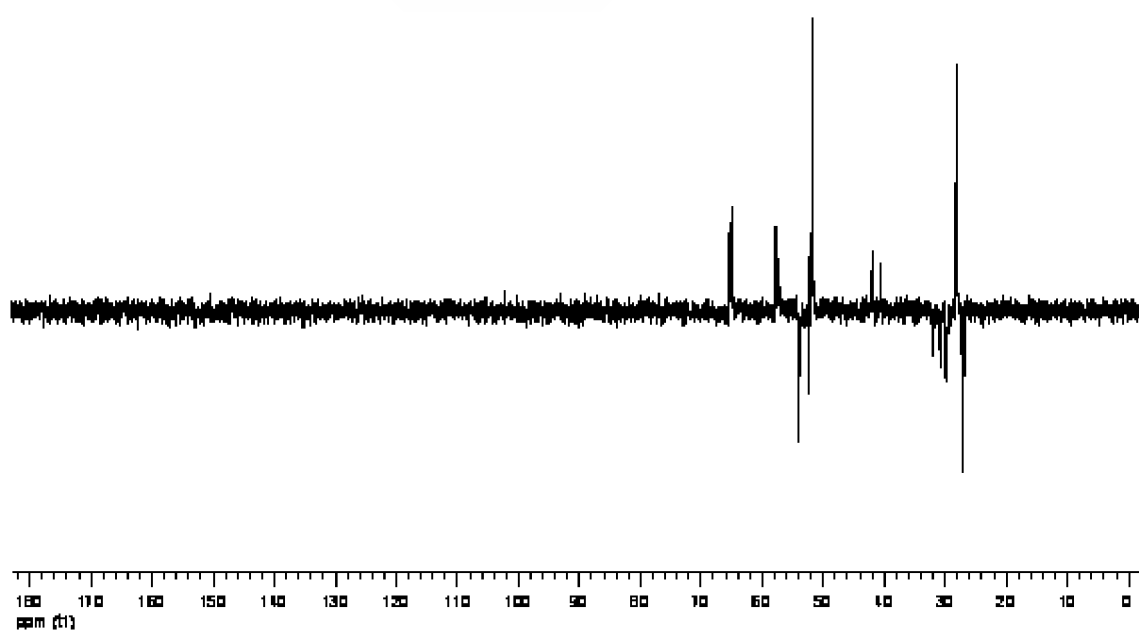
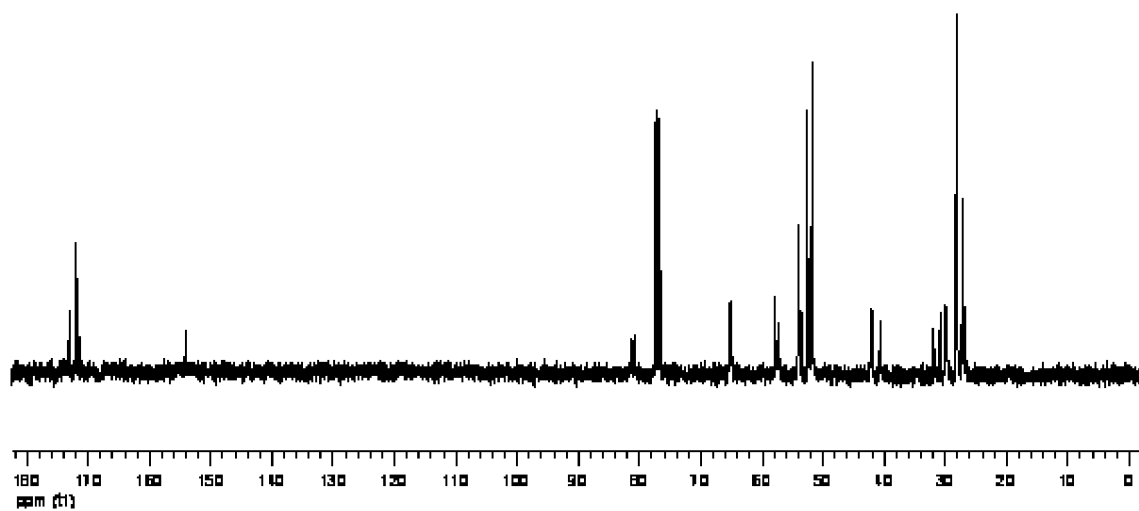
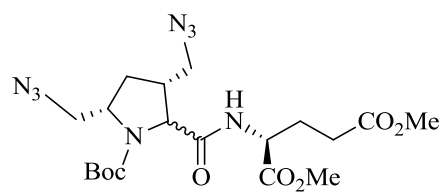
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 6,56 (d, *J* = 7,4 Hz), 6,52-6,48 (m), 1H, intercambia con D₂O, NH], 4,56 (dd, *J* = 12,7, 7,3 Hz, 1H, 2-H_{Glu}), 4,13-3,97 (m, 3H), 3,73 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,66 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,53-3,43 (m, 3H), 2,45-2,31 (m, 4H), 2,24-2,15 (m, 1H), 2,06-1,94 (m, 1H), 1,72-1,61 (m, 1H), 1,45 (s, 3H, CH₃), 1,39 (s, 6H, 2 CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,16 (C), 171,88 (C), 171,35 (C), 154,01 (C), 81,39, 81,08 y 80,88 (C), 65,37 y 65,02 (CH), 57,81 y 57,31 (CH), 53,98, 53,75 y 53,41 (CH₂), 52,51 y 51,93 (CH), 52,39 (CH₂), 51,64 (CH₃), 42,25 y 42,01 (CH), 40,66 (CH), 32,0 y 30,78 (CH₂), 30,08, 29,91 y 29,63 (CH₂), 28,25 y 28,12 (3 CH₃), 27,16 y 26,83 (CH₂).

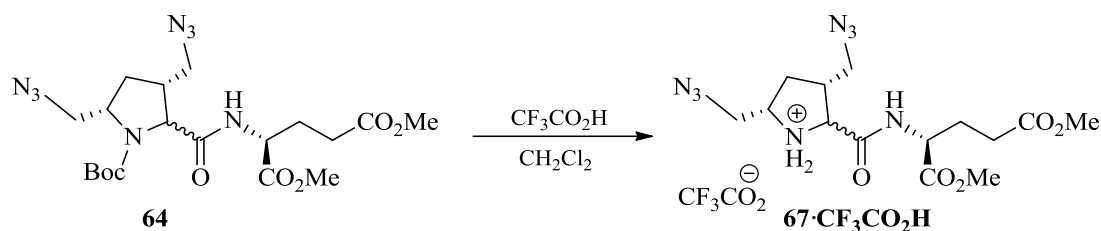
EM-IQ *m/z* (%): 483 [(M + 1)⁺, 1], 384 (26), 383 (100), 340 (10), 327 (17), 326 (28), 312 (12), 180 (23), 57 (28).

Microanálisis. Calculado para C₁₉H₃₀N₈O₇ (482,49): C 47,30, H 6,27, N 23,22. Encontrado: C 47,62, H 6,41, N, 23,54.





3.39. Trifluoroacetato de (2*S*)-2-[[[(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidometil)-1-(*terc*-butoxicarbonyl)pirrolidina-2-carbonyl]amino]pentanodiato de dimetilo (mezcla de los diastereoisómeros 67a·CF₃CO₂H y 67b·CF₃CO₂H).**



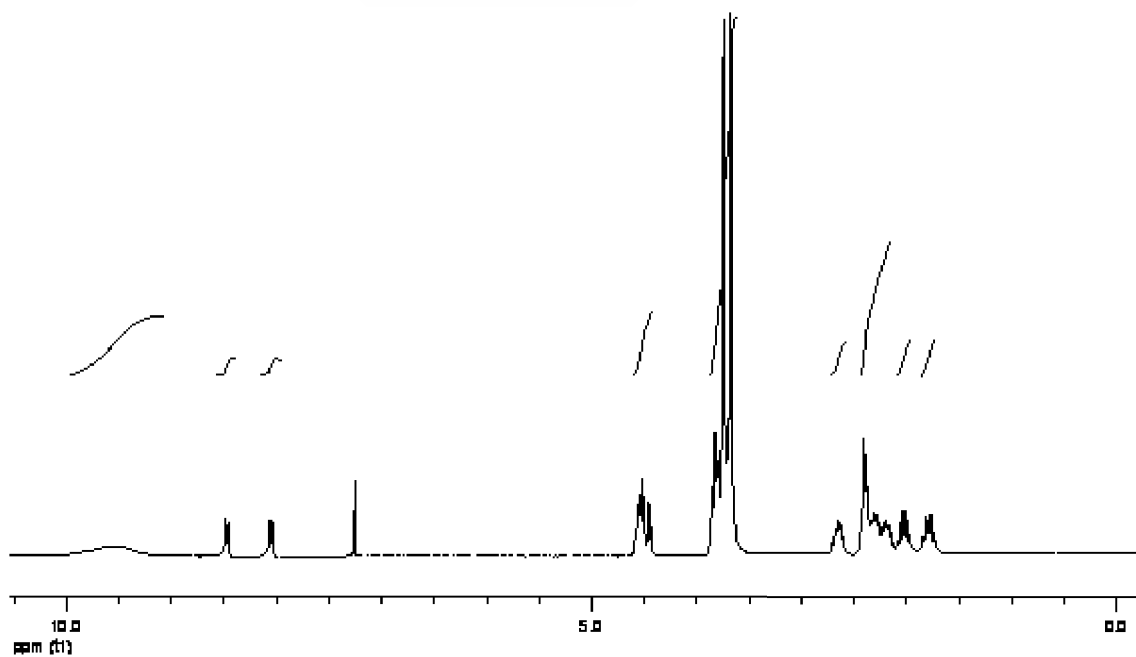
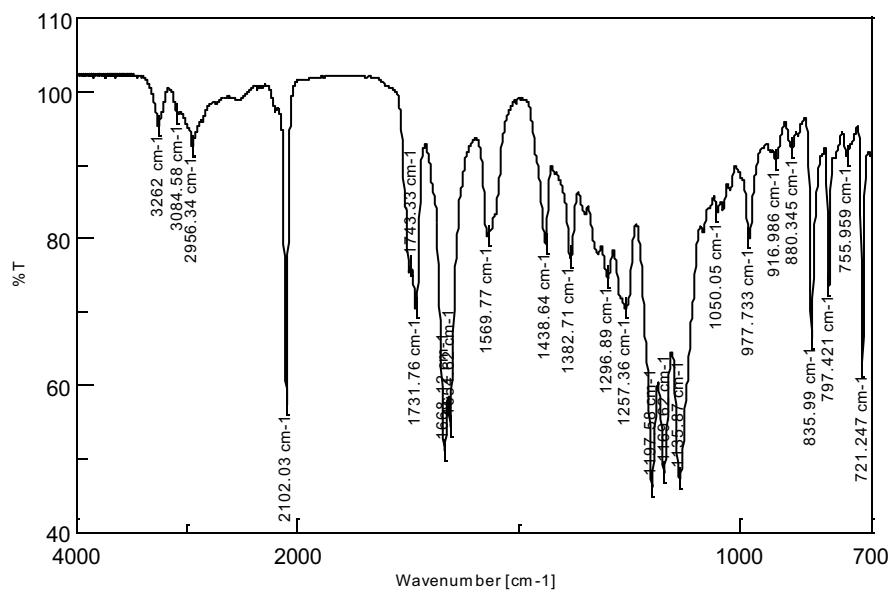
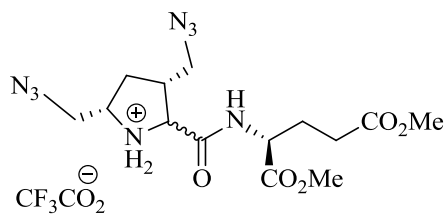
Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.32.1, a partir de **64** (0,79 g, 1,64 mmol) se obtuvo tras la elaboración habitual, por tratamiento con una mezcla de AcOEt/ **67·CF₃CO₂H** (0,61 g, 75%) como un sólido blanco, p.f. = 109–111 °C.

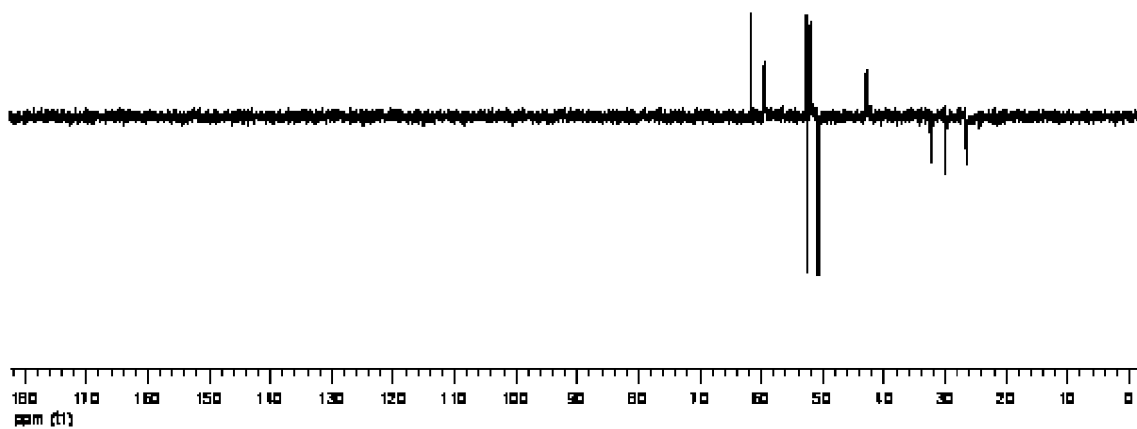
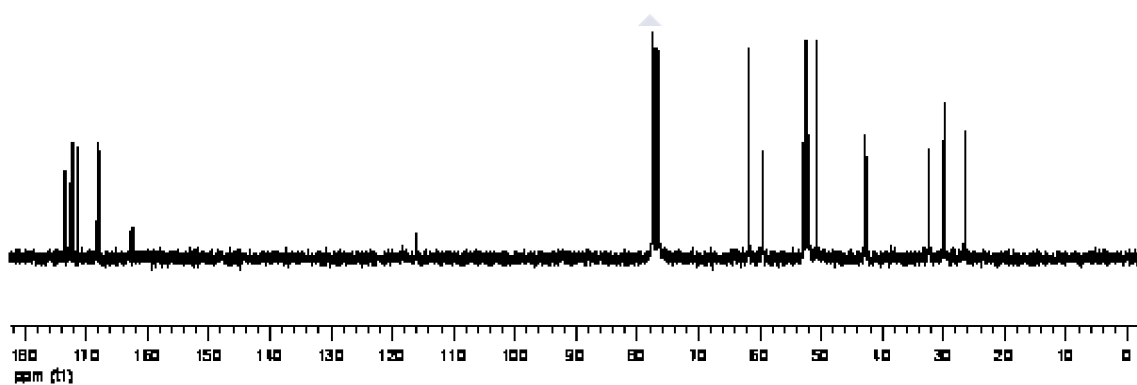
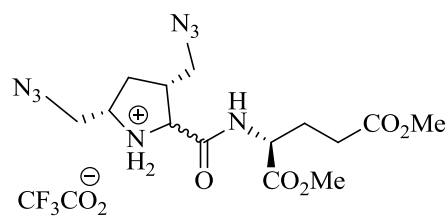
IR v (cm⁻¹): 3262, 2956, 2102, 1743, 1732, 1668, 1655, 1570, 1439, 1383, 1257, 1198, 1169, 1136, 836, 797, 721.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 9,47 (s an, 2H, intercambia en D₂O, NH y CO₂H), 8,47 y 8,05 (2 d, *J* = 7,7 Hz, 1H, intercambia en D₂O, NH), 4,59-4,44 (m, 2H), 3,86-3,64 (m, 5H), 3,76 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,74 (s, 3H, CO₂CH₃), 2,70-2,60 (m, 1H), 2,43-2,13 (m, 4H), 2,03 (dd, *J* = 14,1, 7,2, 6,9 Hz, 1H), 1,79 (dd, *J* = 23,2, 10,2 Hz, 1H).

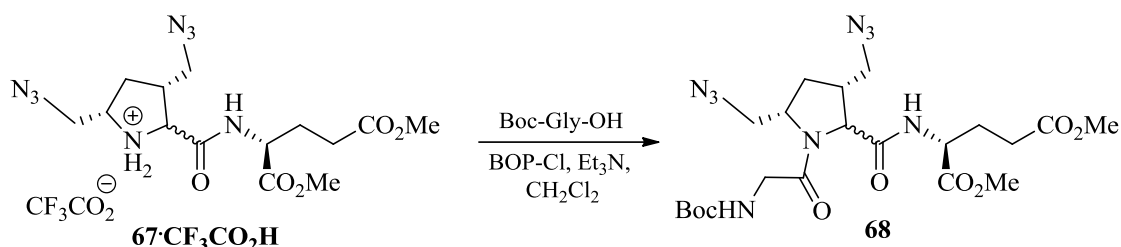
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,52 y 172,74 (C), 172,22 y 171,35 (C), 168,27 y 167,94 (C), 162,72 y 162,23 (C), 116,10 y 115,99 (C), 61,74 (CH), 59,57 y 59,46 (CH), 52,83 y 52,70 (CH), 52,48 (CH₂), 52,31 y 52,22 (CH₃), 52,06 y 51,87 (CH₃), 50,74 (CH₂), 42,91 y 42,62 (CH), 32,35 y 32,28 (CH₂), 29,99 y 29,89 (CH₂), 26,57 y 26,49 (CH₂).

EM-IE-TDV *m/z* (%): 383,2 (M⁺, 100).





3.40. (2S)-2-[[[(2R*,3S,*5R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-[2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]acetil]pirrolidina-2-carbonil]amino]pentanodiato de dimetilo (mezcla de diastereoisómeros 68a y 68b)



Sobre una disolución de **67**·CF₃CO₂H (150 mg, 0,32 mmol) y Boc-Gly-OH (62 mg, 0,35 mmol) en CH₂Cl₂ seco (15 mL) se añadió, gota a gota, Et₃N seca (0,12 mL, 0,87 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 10 min, tras los cuales se añadió BOP-Cl (110 mg, 0,43 mmol) y la mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente 72 h. La disolución resultante se lavó sucesivamente con una disolución HCl 10% (10 mL), y una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 mL), la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a sequedad, rindiendo un aceite amarillo claro (120 mg) que se fraccionó mediante dos cromatografías en columna sobre gel de sílice consecutivas, empleando como eluyente en la primera una mezcla de hexano/AcOEt (3:1), y en la segunda una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (50:1). La eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto, permitió aislar **68** (60 mg, 37%) como un aceite amarillo claro.

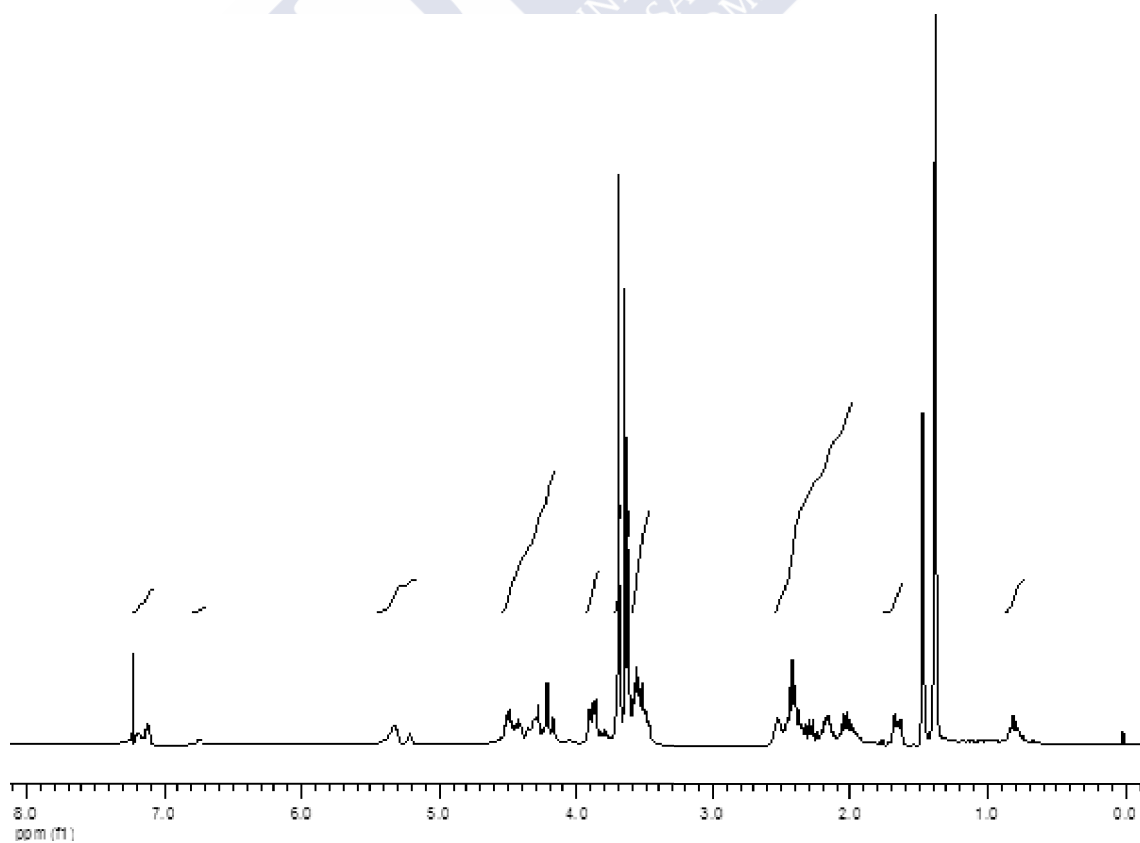
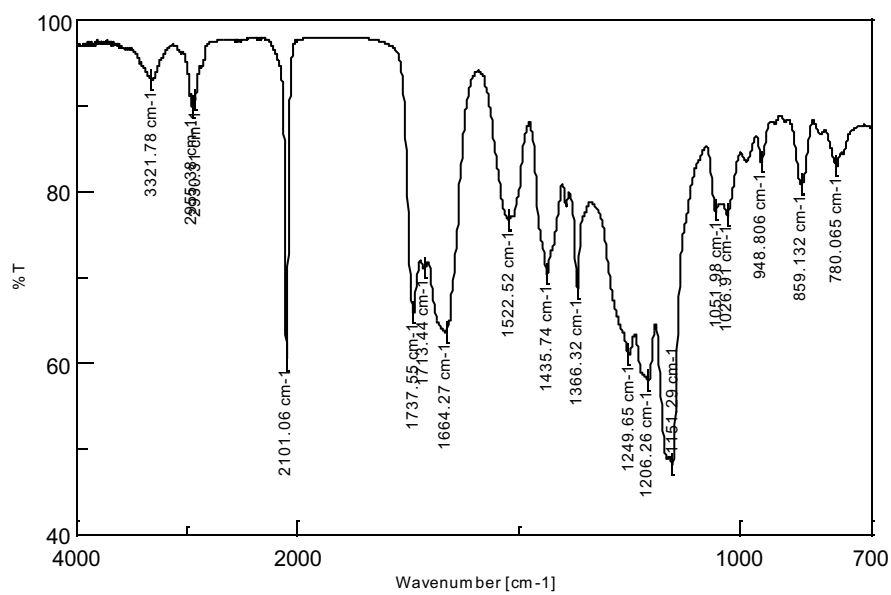
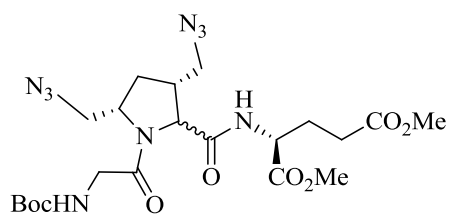
IR v (cm⁻¹): 3322, 2955, 2101, 1737, 1713, 1664, 1522, 1436, 1366, 1250, 1206, 1152, 859, 780.

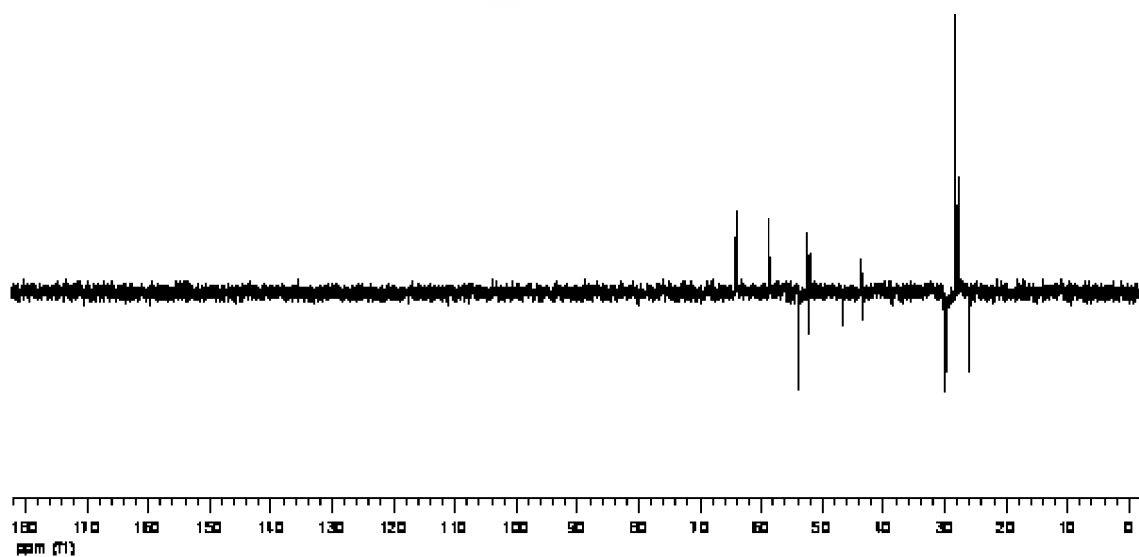
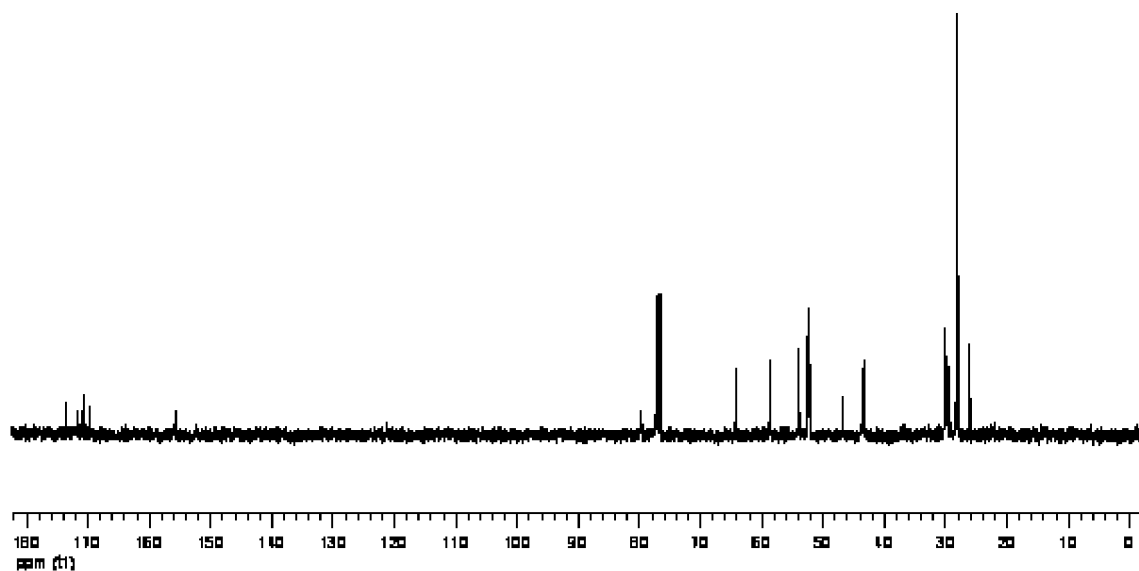
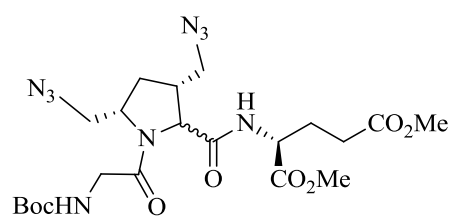
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 7,20-7,16, 7,13-7,11 y 6,75-6,73 (3 m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 5,33-5,31 y 5,22 (m y s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,52-4,06 (m, 4H), 3,91-3,72 (m, 1H), 3,70, 3,69, 3,65 y 3,63 (4 s, 6H, 2 CO₂CH₃), 3,62-3,45 (m, 3H), 2,53-1,93 (m, 6H), 1,77-1,63 (m, 1H), 1,48, 1,47, 1,39 y 1,38 (4 s, 9H, 3 CH₃), 0,85-0,79 (m, 1H).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,71 y 173,65 (C), 171,65 y 171,55 (C), 170,87 y 170,76 (C), 169,76 y 169,67 (C), 155,71 (C), 79,71 (C), 64,26 y 64,15 (CH), 58,63 (CH), 53,88 (CH₂), 52,59, 52,34 y 52,04 (2 CH₃), 52,23 y 52,20 (CH₂), 46,76 (CH₂), 43,60 (CH), 43,37 (CH₂), 30,11, 29,76 y 29,63 (CH₂), 28,30 y 28,23 (3 CH₃), 27,78 (CH), 26,08 (CH₂).

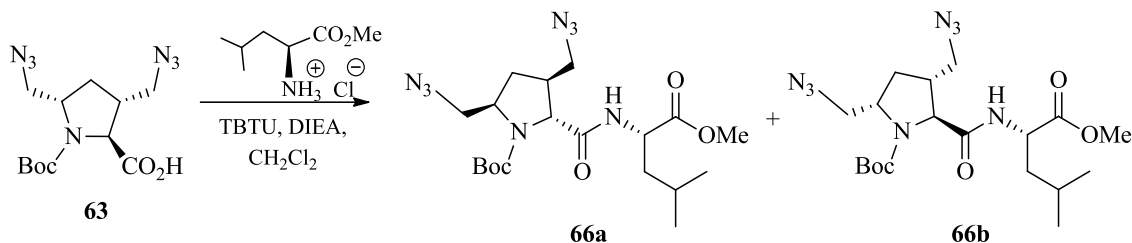
EM-IE-TDV m/z (%): 562,23 [(M + Na)⁺, 100].

EM-AR m/z: calculado para C₂₁H₃₃N₉O₈ + Na, 562,2350; encontrado, 562,2382





3.41. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucinato de metilo (66a**) y L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucinato de metilo (**66b**)**



Sobre una disolución de **63** (0,95 g, 2,92 mmol) en CH₂Cl₂ seco (50 mL) a 0 °C y bajo argón se añadió TBTU (1,49 g, 4,64 mmol) y la suspensión resultante fue agitada a 0 °C durante 30 min. Se añadió clorhidrato de L-leucinato de metilo (0,64 g, 3.50 mmol) en CH₂Cl₂ seco (50 mL) y DIEA (2,04 mL, 11,7 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 0 °C y posteriormente a temperatura ambiente hasta que no se observó la presencia de material de partida (CCF) en el medio de reacción, 15 h. Tras la eliminación del disolvente a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en AcOEt (200 mL) y la disolución resultante se lavó sucesivamente con disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 × 100 mL) y disolución acuosa saturada de NaCl (100 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a sequedad, el residuo aceitoso obtenido (1,43 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como mezcla eluyente hexano/AcOEt (5:1), separándose en las primeras fracciones que contenían producto el diastereoisómero **66a** (0,65 g, 49%), en un segundo grupo de fracciones se aisló mezcla de diastereoisómeros **66a** + **66b** (0,35 g, 27%), y finalmente de un tercer grupo de fracciones se aisló el diastereoisómero **66b** (0,26 g, 20%).

Compuesto **66a**: sólido blanco, p.f. = 77–78 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -35,60$ (*c* 1,01, MeOH).

IR ν (cm⁻¹): 3288, 2961, 2095, 1748, 1698, 1654, 1541, 1365, 1255, 1195, 1138, 1012, 784.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 6,50 y 6,01 (2 s an 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,61-4,55 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4,12-4,03 (m, 1H, 2-H_{Pro}), 3,99-3,95 (m, 2H, 5-H_{Pro}), 3,71 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,54-3,42 (m, 3H), 2,34-2,22 (m, 2H), 1,67-1,49 (m, 4H), 1,38 (s, 9H, 3 CH₃), 0,92 (d, *J* = 4,5 Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu}).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 173,12 (C), 171,61 (C), 154,16 (C), 81,21 (C), 65,43 (CH), 57,80 (CH), 54,14 (CH₂), 52,46 (CH₂), 52,31 (CH₃), 50,58 (CH), 41,92 (CH₂), 30,90 (CH₂), 29,68 (CH), 28,12 (3 CH₃), 24,87 (CH), 22,72 (CH₃), 21,93 (CH₃).

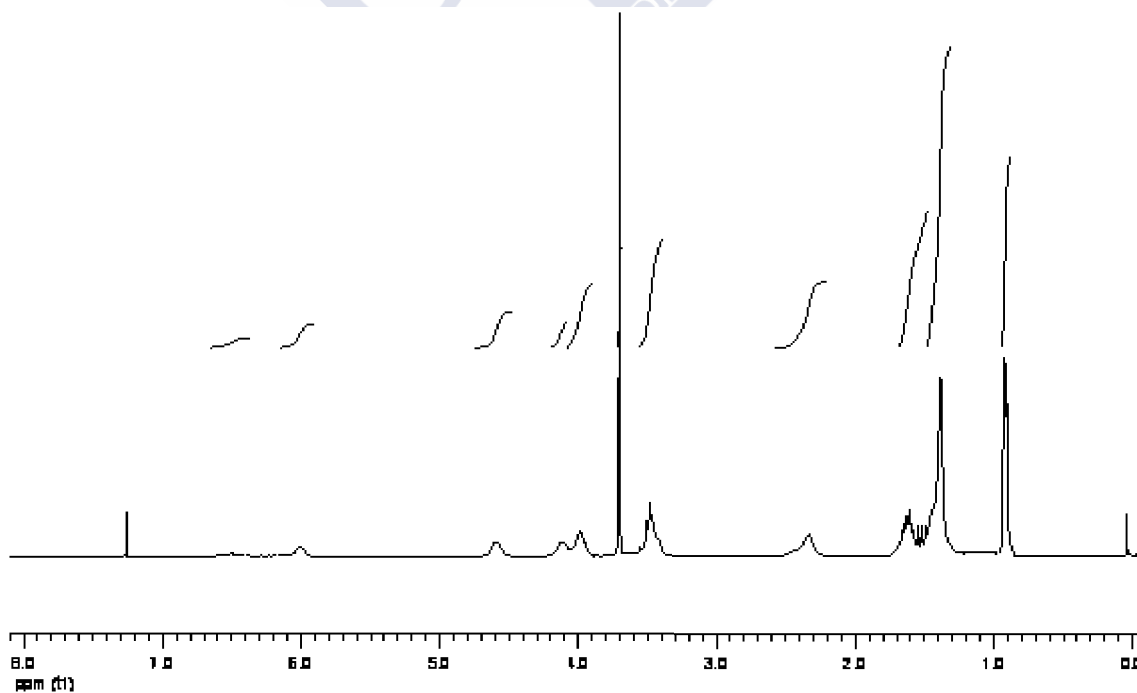
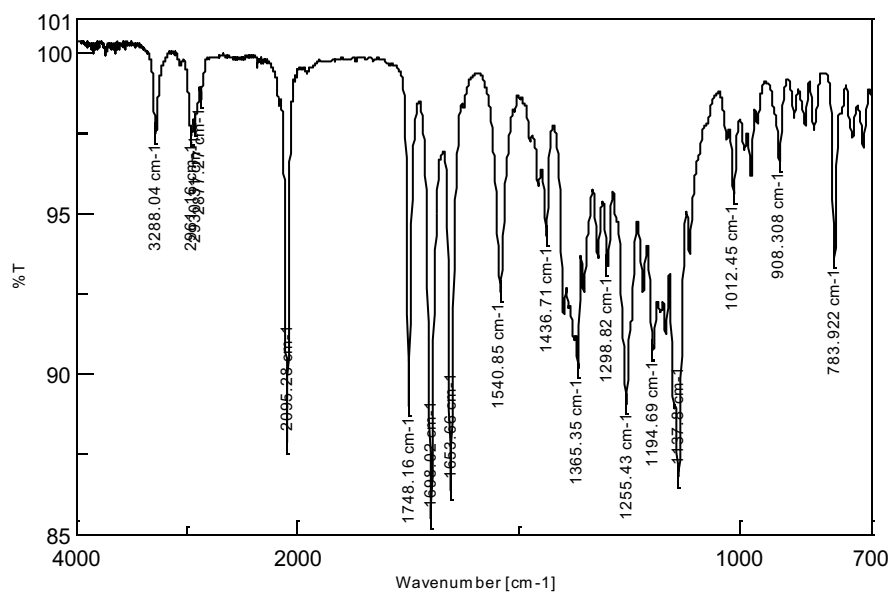
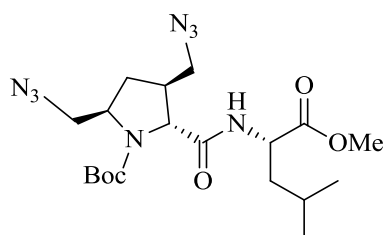
EM-IE-TDV m/z (%): 475 [(M + Na)⁺, 100]

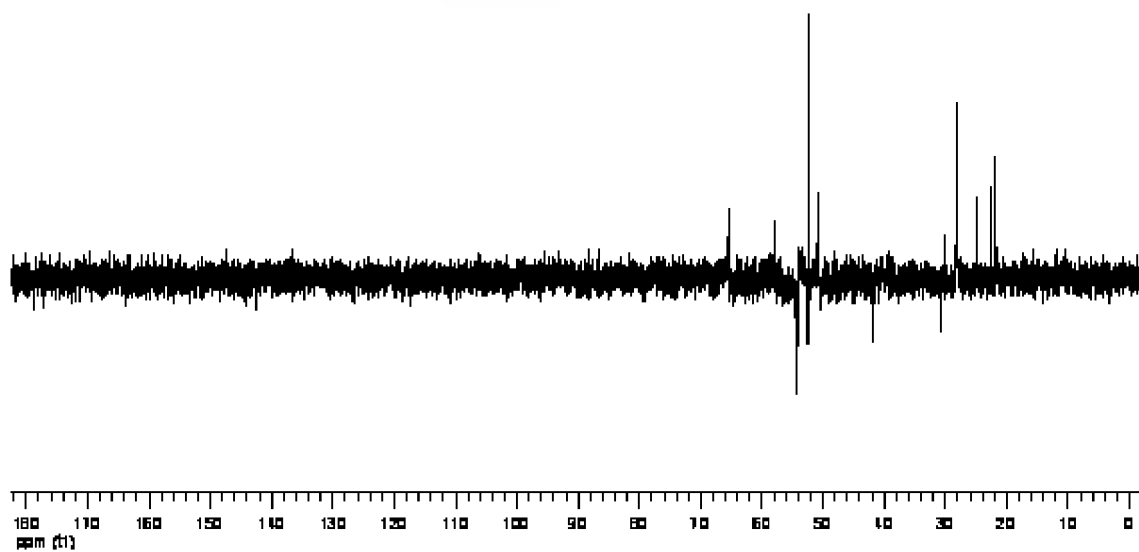
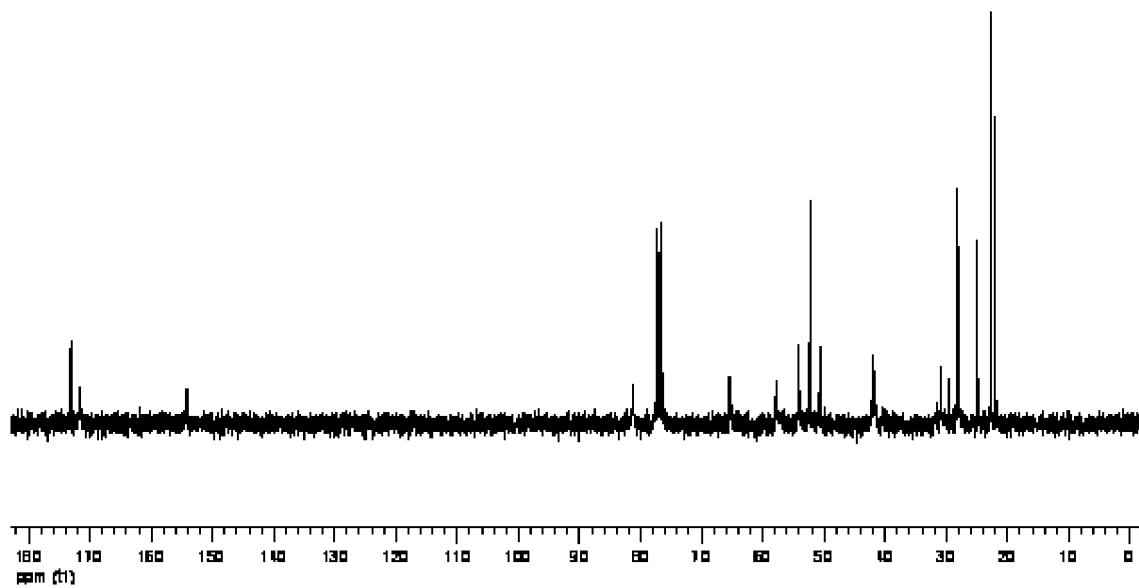
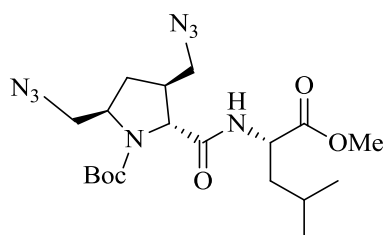
Microanálisis. Calculado para C₁₉H₃₂N₈O₅ (452,51): C 50,43, H 7,13, N 24,76. Encontrado: C 50,87, H 7,34, N, 24,61.

Un monocristal adecuado para análisis por difracción de rayos X, se consiguió mediante recristalización del compuesto **66a** en una mezcla de Et₂O/isooctano (1:3), tras permanecer algunos días en un lugar fresco, oscuro y sin vibraciones.

<i>Tabla 6. Datos del cristal y refinamiento de la estructura de 66a</i> ³²⁴	
Fórmula empírica	C ₁₉ H ₃₂ N ₈ O ₅
Peso fórmula	452,53
Temperatura	100,0 K
Sistema cristalino	Ortorrómico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celdilla unidad	a = 9,7233 (5) Å b = 11,6925 (8) Å c = 20,8183 (17) Å
Volumen	V = 2366,8 (3) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1,27 Mg/m ³
Coeficiente de absorción	0,09 mm ⁻¹
F(000)	968
Tamaño del cristal	0,28 × 0,16 × 0,11 mm ³
Intervalo de theta para la recogida de datos	2,0 a 26,0°
Intervalos de índices	<i>h</i> = -11 → 12, <i>k</i> = 0 → 14, <i>l</i> = 0 → 25
Reflexiones recogidas	20454
Reflexiones independientes	4659 [R(int) = 0,045]
Complejidad para theta = 26,02°	100 %
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz entera en F ²
Datos / restricciones / parámetros	4659 / 10 / 310
Bondad del ajuste en F²	1,04
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0388, wR2 = 0,0809
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0516, wR2 = 0,0874
Máxima diferencia de pico y agujero	0,15 y -0,23 e.Å ⁻³

³²⁴ Los datos cristalográficos del compuesto **66a** han sido depositados en el Centro de Datos Criatlográficos de Cambridge como publicación privada CCDC 924409. Copias de estos datos pueden obtenerse libres de cargo en la aplicación del CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.





Compuesto **66b**: sólido blanco, p.f. = 63–65 °C.

$[\alpha]_D^{25} = + 2,80$ (*c* 1,02, MeOH).

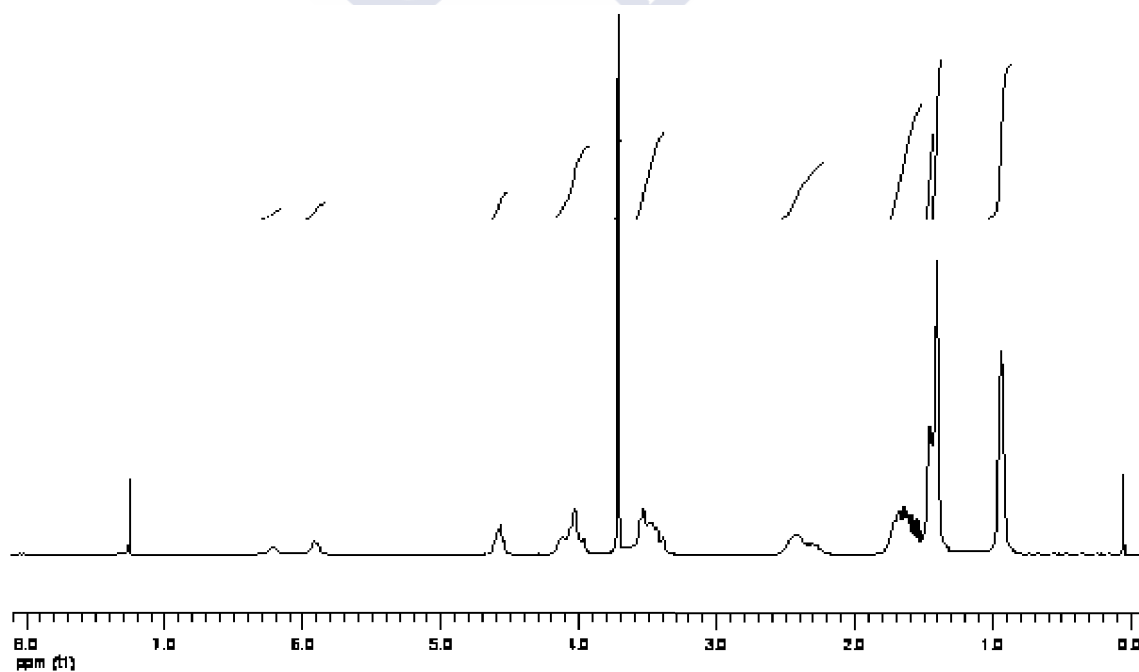
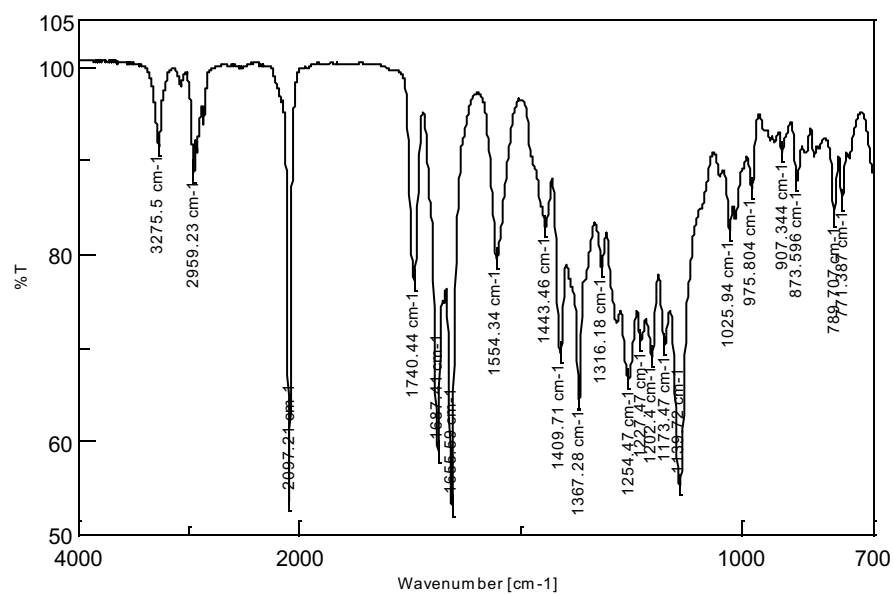
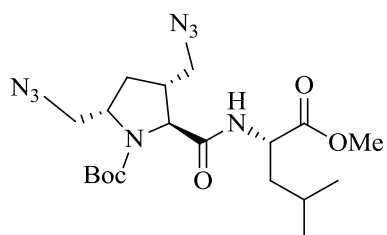
IR v (cm⁻¹): 3275, 2959, 2097, 1740, 1687, 1656, 1554, 1367, 1254, 1195, 1140, 1026, 790.

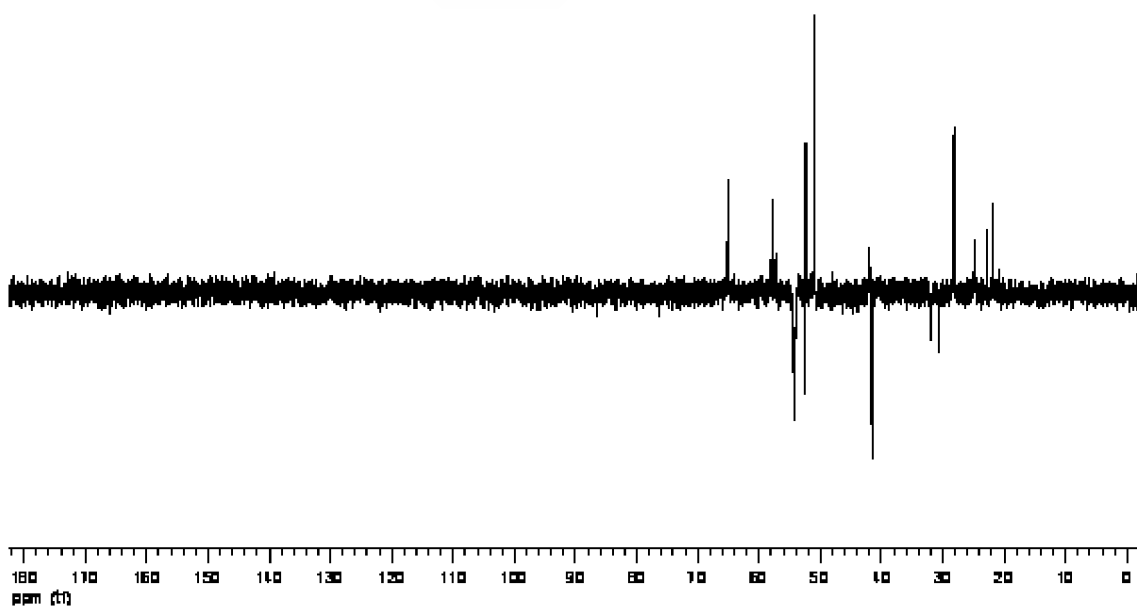
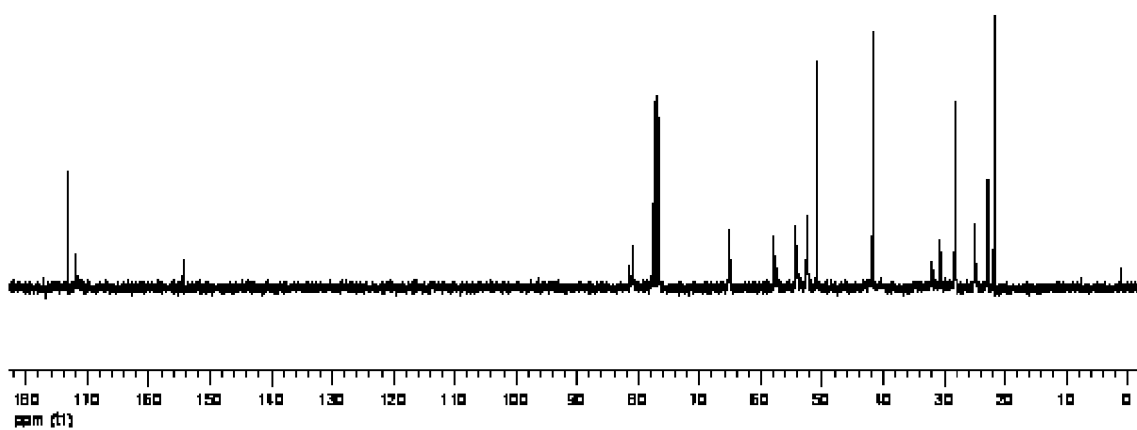
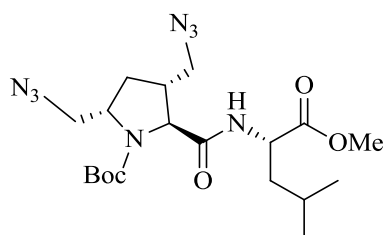
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 6,23 y 5,90-5,92 (s an y m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,61-4,57 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4,12-3,96 (m, 3H, 2-H_{Pro} y 5-H_{Pro}), 3,72 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,55-3,39 (m, 3H), 2,40-2,26 (m, 2H), 1,70-1,49 (m, 4H), 1,45 (s, 3H, CH₃), 1,40 (s, 6H, 2 CH₃), 0,93 (m, 6H, 2 CH₃_{Leu}).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 173,24 (C), 171,83 (C), 154,25 (C), 81,44 y 80,92 (C), 65,05 (CH), 57,85 y 57,25 (CH), 54,28 y 54,06 (CH₂), 52,54 (CH₂), 52,37 (CH), 50,83 (CH₃), 41,96 (CH), 41,57 (CH₂), 31,98 y 30,67 (CH₂), 28,15 (3 CH₃), 24,82 y 24,55 (CH), 21,76 (2 CH₃).

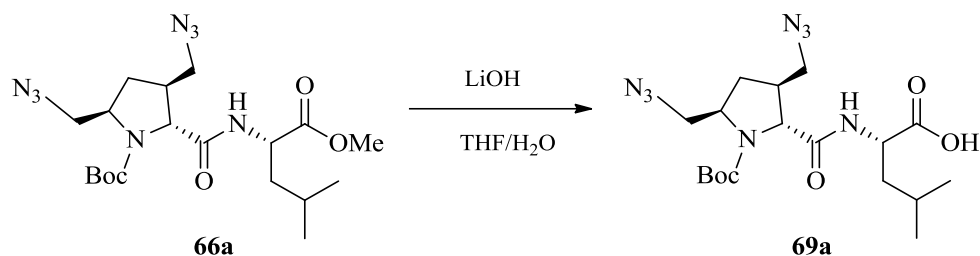
EM-IQ *m/z* (%): 453 [(M + 1)⁺, 1], 354 (26), 353 (100), 310 (14), 297 (25), 296 (59), 282 (18), 180 (64), 152 (15), 86 (15), 68 (23), 57 (51), 56 (13).

Microanálisis. Calculado para C₁₉H₃₂N₈O₅ (452,51): C 50,43, H 7,13, N 24,76. Encontrado: C 50,79, H 7,36, N, 24,92.





3.42. D-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucina (69a**)**



Seguendo el procedimiento descrito para la preparación de **63** (véase apartado 3.34) a partir de **66a** (0,65 g, 1,44 mmol) tras 2,5 h de reacción y elaboración habitual, se obtuvo **69a** como un sólido blanco (0,46 g, 73%), p.f. = 178–179 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -12,20$ (*c* 1,0, MeOH).

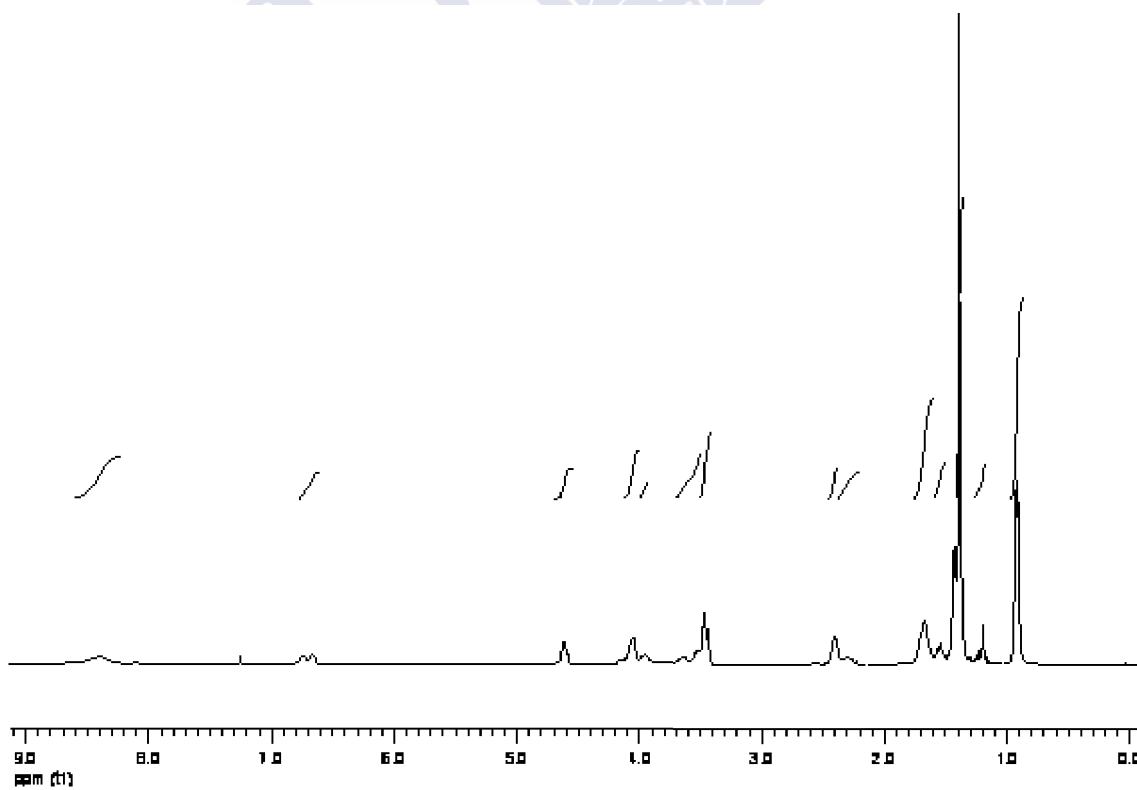
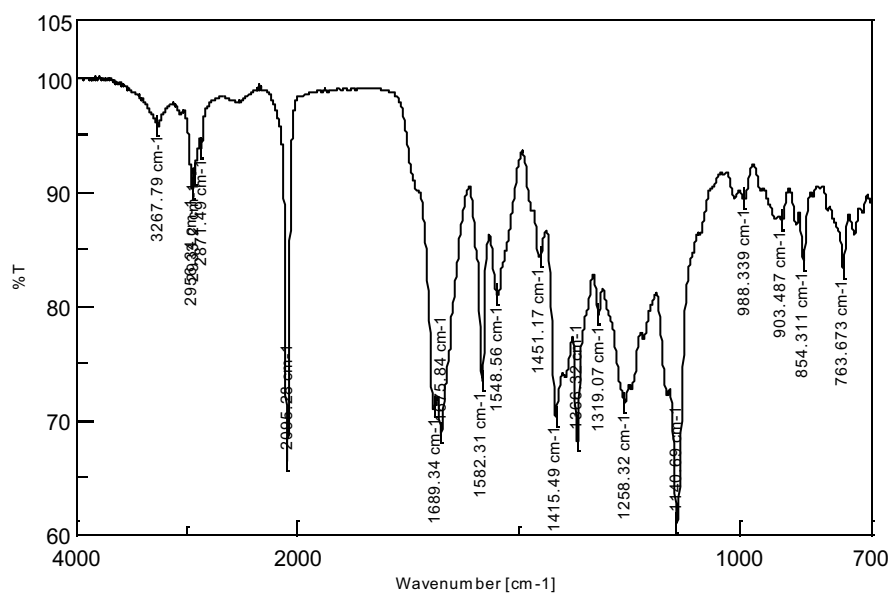
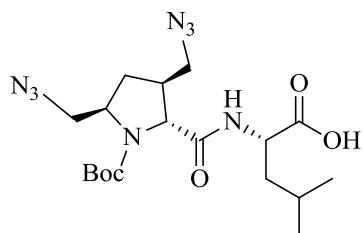
IR v (cm⁻¹): 3268, 2956, 2095, 1689, 1675, 1582, 1415, 1366, 1258, 1140, 764.

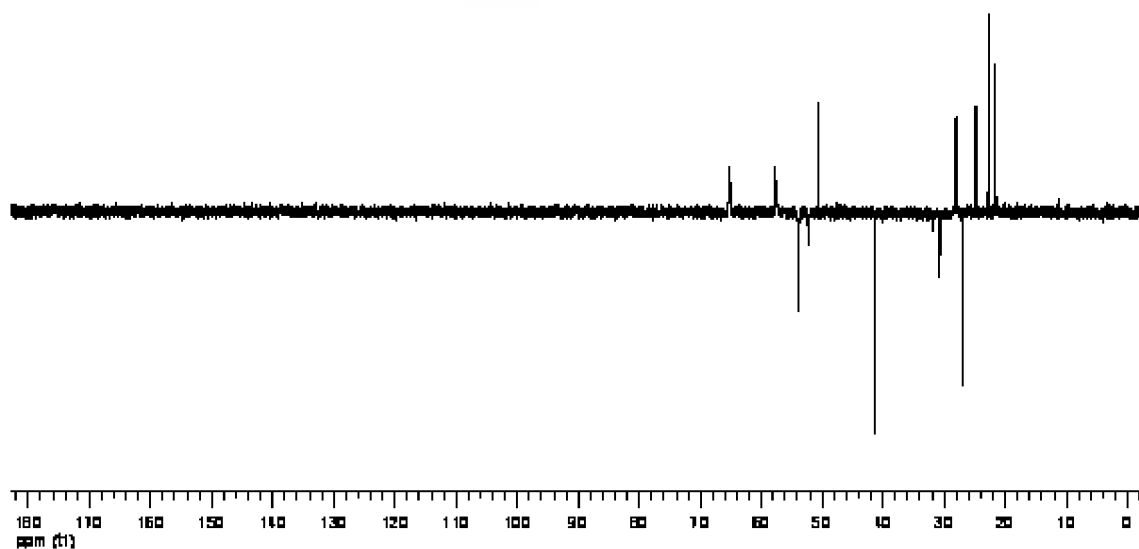
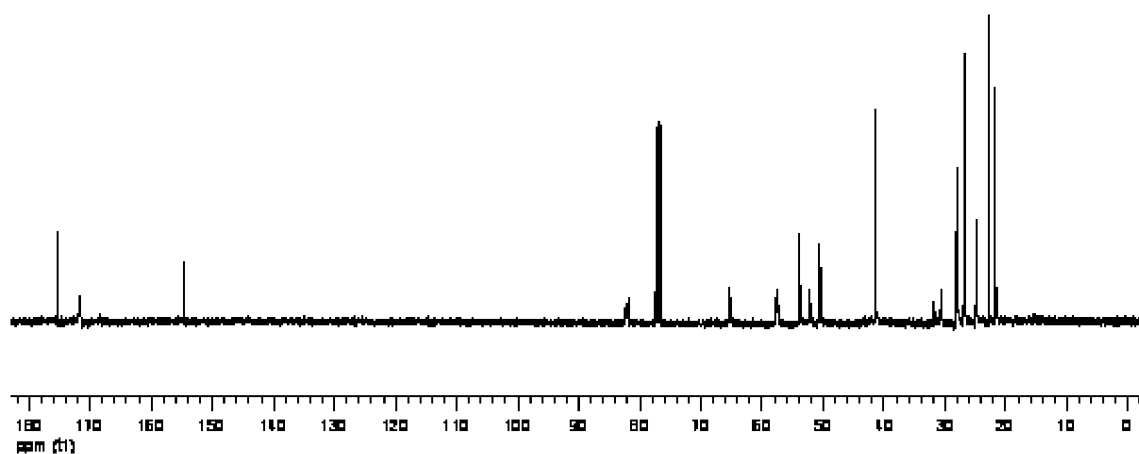
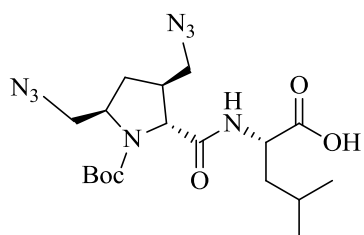
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 8,39 (s an, 1H, intercambia con D₂O, CO₂H), 6,73 y 6,66 (2 m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,62-4,59 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4,05-3,95 (2 m, 2H), 3,70-3,52 (2 m, 1H), 3,48-3,44 (m, 2H), 2,45-2,32 (m, 1H), 2,29-2,23 (m, 1H), 1,67-1,60 (m, 3H), 1,57-1,48 (m, 1H), 1,43 y 1,39 (2 s, 9H, 3 CH₃), 1,27-1,17 (m, 1H), 0,90-0,93 (m, 6H, 2 CH₃_{Leu}), 6H, 2 CH₃_{Leu}).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 175,29 (C), 171,78 (C), 154,62 (C), 81,92 (C), 65,39 y 65,17 (CH), 57,68 y 57,41 (CH), 53,84 y 52,16 (CH₂), 50,52 (CH), 41,45 (CH₂), 31,83 y 30,74 (CH₂), 28,23 y 28,07 (CH), 26,84 (CH₂), 24,79 (CH), 22,81 (3 CH₃), 21,71 y 21,45 (2 CH₃).

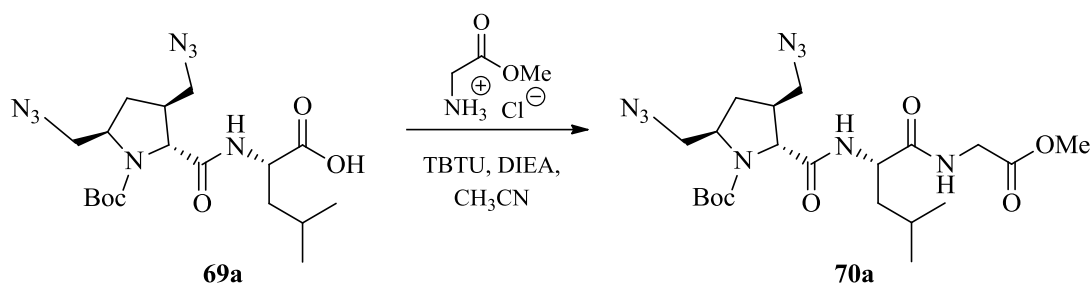
EM-IE-TDV *m/z* (%): 461,2 [(M + Na)⁺, 100]

Microanálisis. Calculado para C₁₈H₃₀N₈O₅ (438,48): C 49,30, H 6,90, N 25,55. Encontrado: C 49,64, H 7,13, N, 25,73.





3.43. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicinato de metilo (70a)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **66** (véase apartado 3.41) a partir de **69a** (0,42 g, 0,96 mmol) disuelto en CH₃CN seco (15 mL) y clorhidrato del glicinato de metilo (0,14 g, 1,15 mmol) en 20 h de reacción y tras la elaboración habitual, se obtuvo un sólido blanquecino (0,48 g) que sometido a fraccionamiento por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente hexano/AcOEt (1:3), rindió **70a** (0,40 g, 82%) como un sólido blanco, p.f. = 158–159 °C.

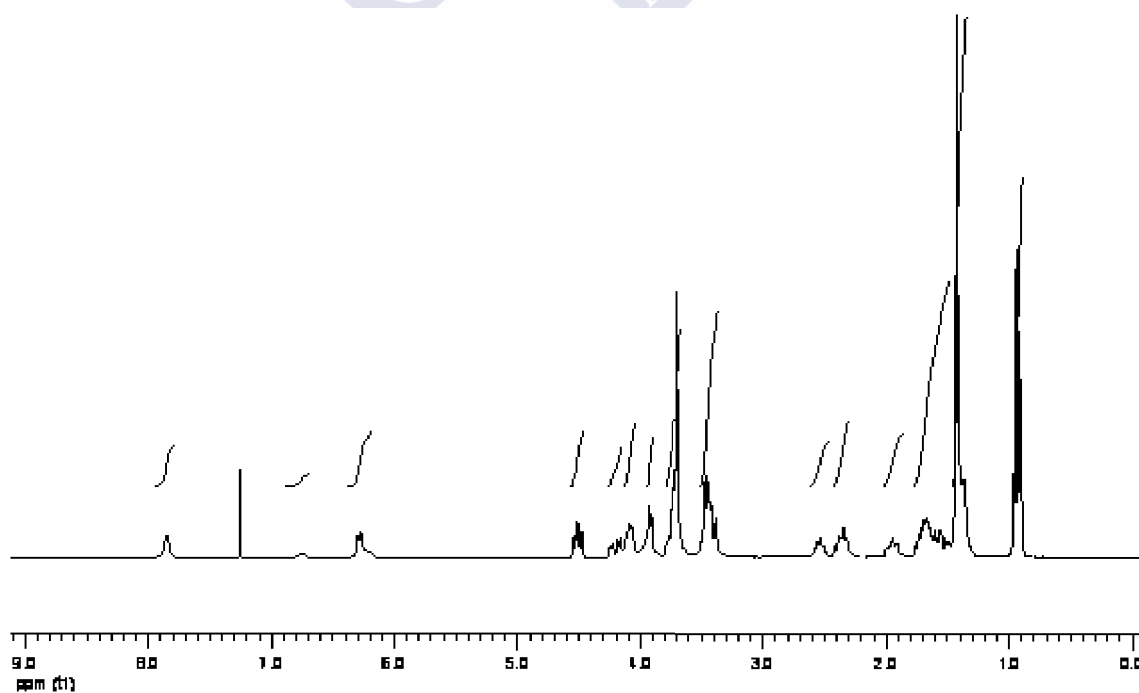
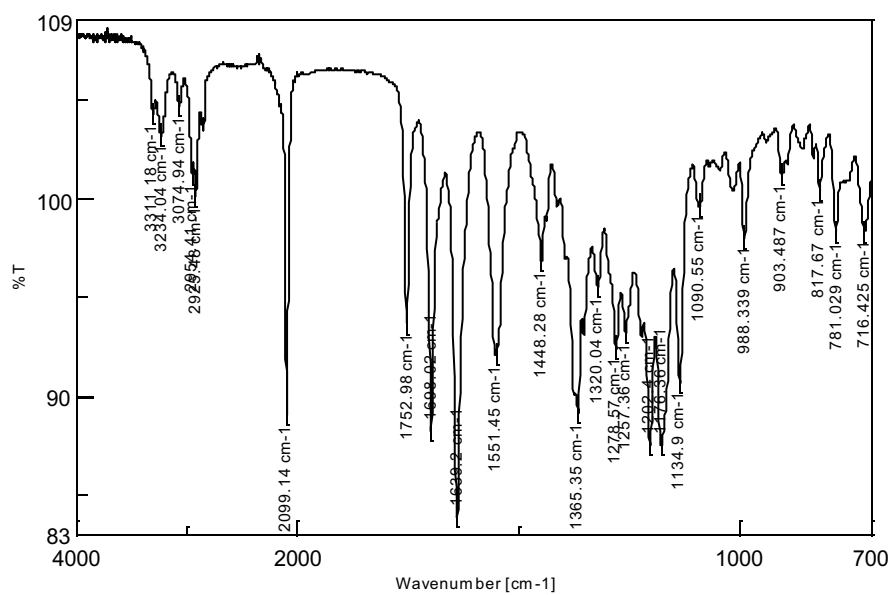
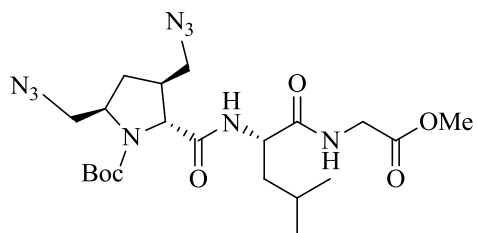
$[\alpha]_D^{25} = -42,60$ (*c* 1,04, MeOH).

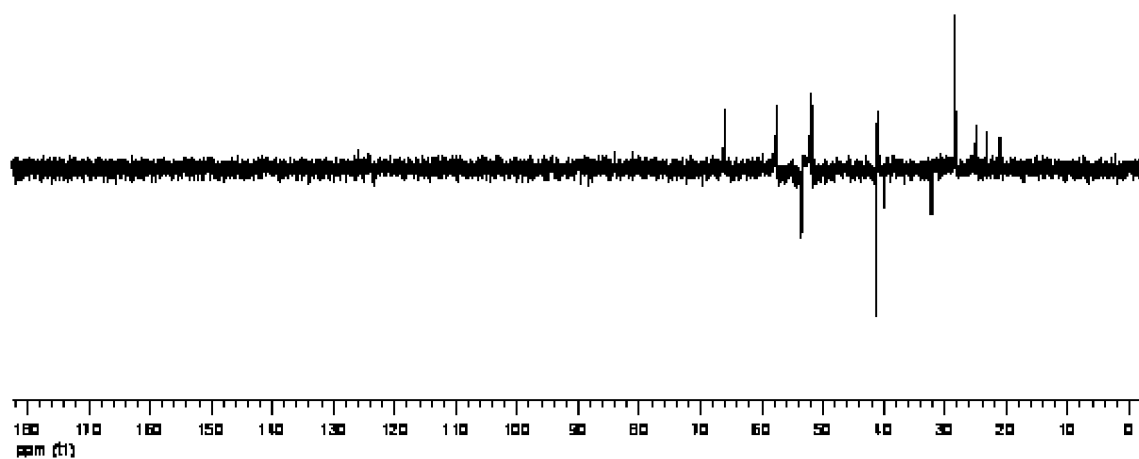
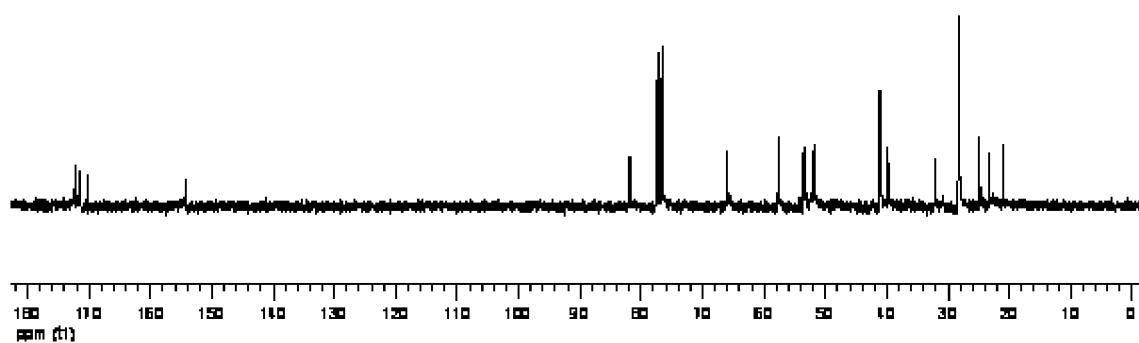
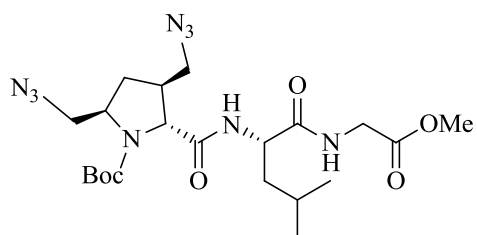
IR v (cm⁻¹): 3234 2954, 2925, 2099, 1753, 1698, 1639, 1551, 1448, 1365, 1279, 1202, 1176, 1135, 988, 781.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 7,85 y 6,73 (2 s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 6,19 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,51 (ddd, *J* = 10,1, 5,8, 4,2 Hz, 1H, 2-H_{Leu}), 4,25-4,17 (m, 1H, 2-H_{Pro}), 4,12-4,08 (m, 1H, CHH_{Gly}), 3,93-3,91 (m, 1H, CHH_{Gly}), 3,79-3,72 (m, 1H), 3,70 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,47-3,38 (m, 3H), 2,58-2,51 (m, 1H), 2,41-2,32 (m, 1H), 1,98-1,91 (m, 1H), 1,76-1,49 (m, 4H), 1,43 y 1,37 (2 s, 9H, 3 CH₃), 0,93 (dd, *J* = 9,7, 6,5 Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu}).

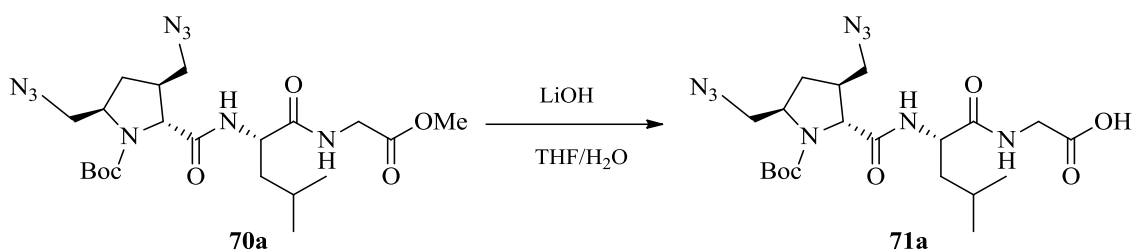
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,25 (C), 171,41 (C), 170,28 (C), 154,32 (C), 81,91 (C), 66,03 (CH), 57,65 (CH), 53,53 (CH₂), 53,27 (CH₂), 52,09 (CH₃), 51,84 (CH), 41,11 (CH₂), 40,97 (CH), 39,83 (CH₂), 32,20 (CH₂), 28,32 (3 CH₃), 24,97 (CH), 23,27 y 21,07 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₂₁H₃₅N₉O₆ + Na: 532,2608. Encontrado: 532,2582.





3.44. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicina (**71a**)



Seguendo el procedimiento descrito para la preparación de **63** (véase apartado 3.34) a partir de **70a** (0,13 g, 0,26 mmol) tras 5 h de reacción y elaboración habitual, se obtuvo **71a** como un sólido blanco (0,11 g, 87%), p.f. = 57–60°C

$[\alpha]_D^{25} = -34,26$ (*c* 1,04, MeOH).

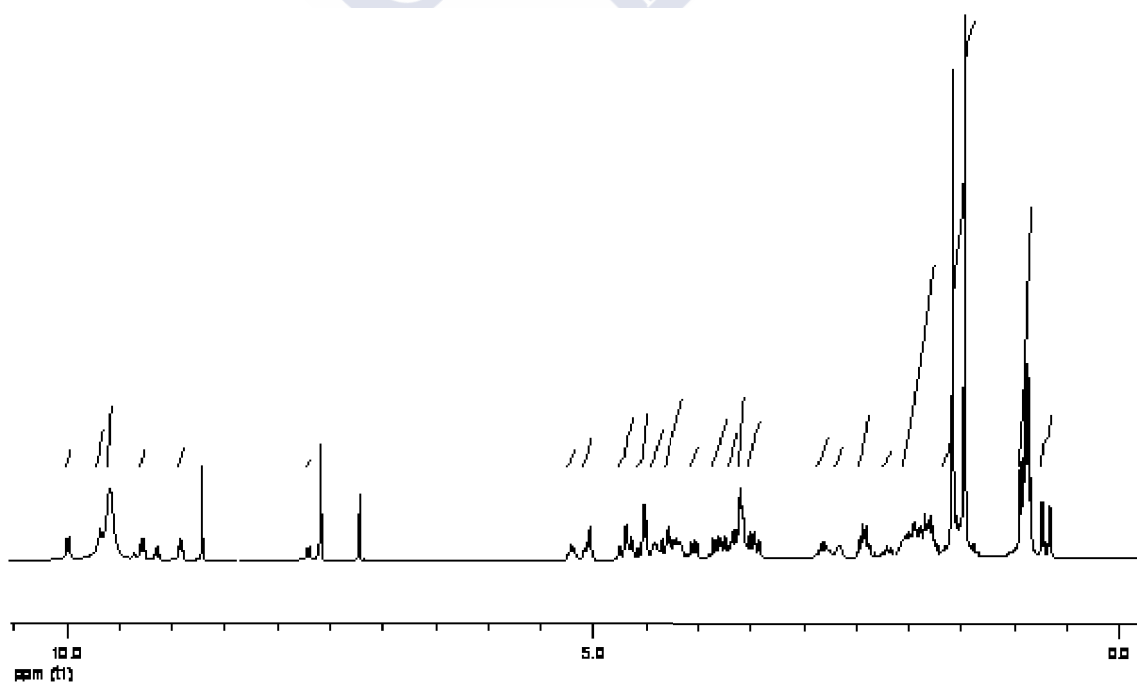
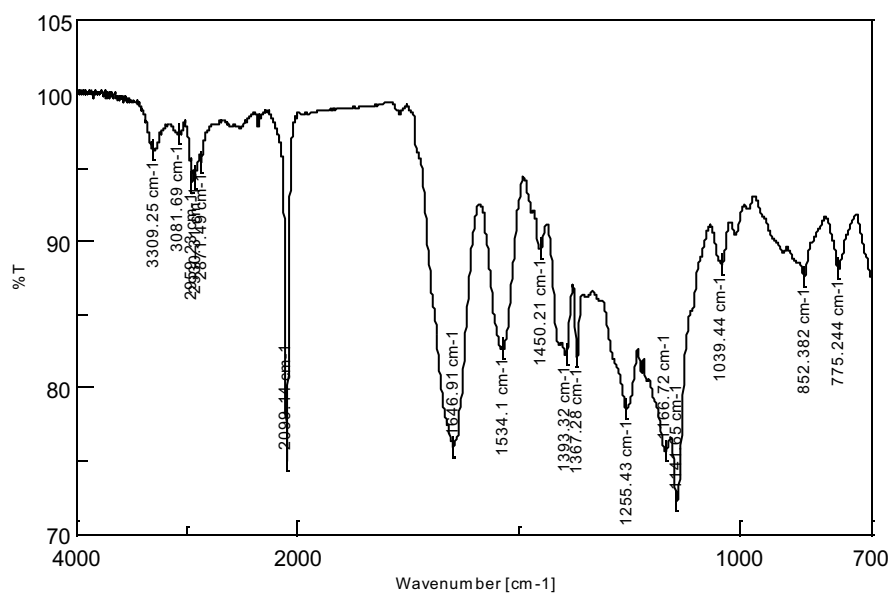
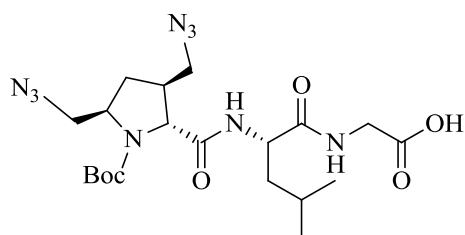
IR v (cm⁻¹): 3309, 2959, 2099, 1748, 1647, 1534, 1393, 1367, 1255, 1167, 1142.

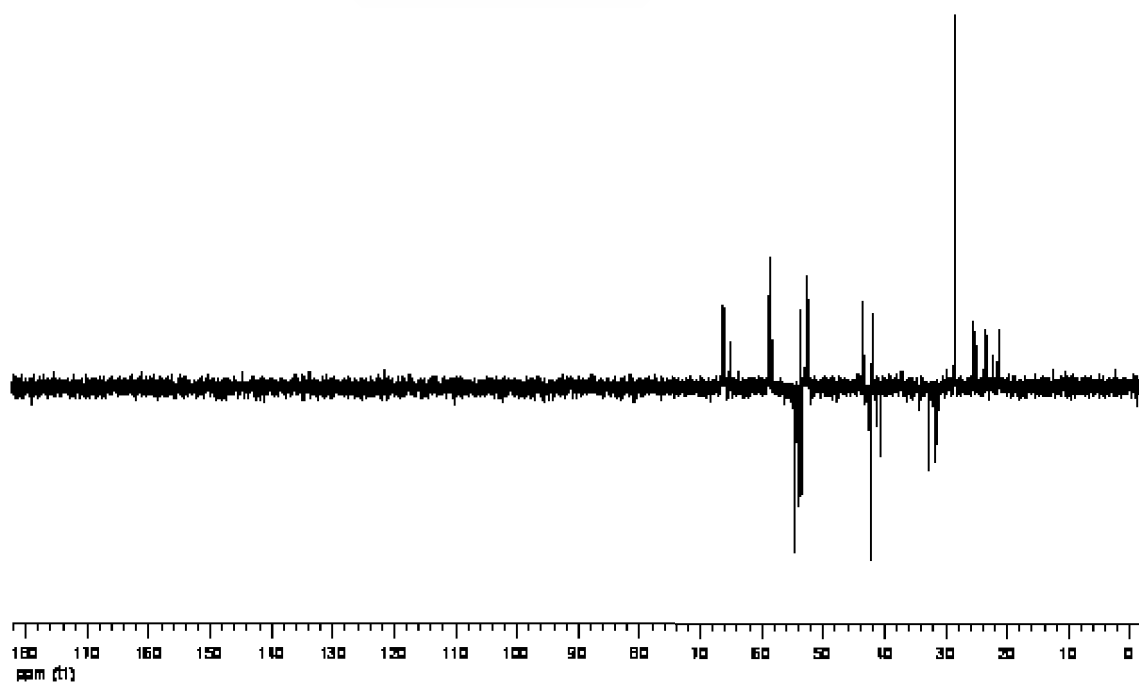
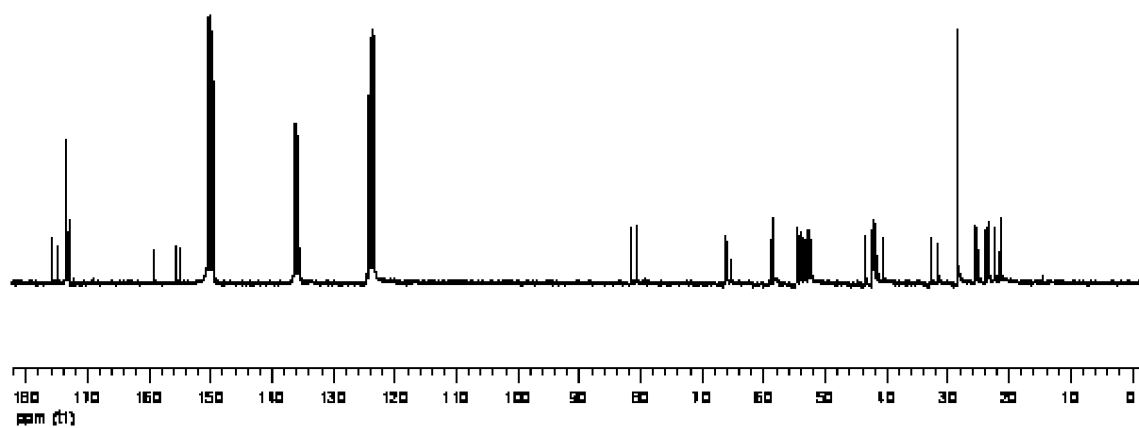
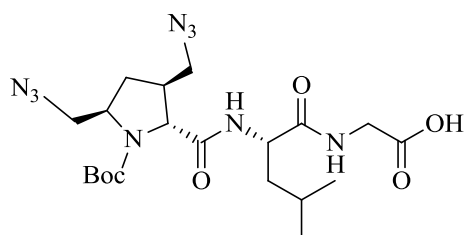
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [9,99 (d, *J* = 8,4 Hz), 9,71–9,67 (m), 9,28 (d, *J* = 8,5 Hz), 9,14 (t, *J* = 5,6 Hz), 8,92 (t, *J* = 5,7 Hz), 7,70 (d, *J* = 8,3 Hz), 2H, intercambian con D₂O, 2 NH], 9,59 (s an, 1H, intercambia con D₂O, CO₂H), 5,30–5,21 y 5,12–5,03 (2 m, 1H), 4,77–4,58 (m, 1H), 4,54–4,45 (m, 1H), 4,44–4,35 y 4,31–4,15 (2 m, 2H), 4,13–3,97, 3,90–3,74, 3,71–3,65, 3,61–3,55, 3,53–3,42 (5 m, 4H), 2,88–2,76 y 2,68–2,63 (2 m, 1H), 2,49–2,38 (m, 2H), 2,24–2,16, 2,06–1,73 (2 m, 4H), 1,58 y 1,47 (2 s, 9H, 3 CH₃), [0,95–0,84 (m), 0,72 (d, *J* = 6,3 Hz), 0,66 (d, *J* = 6,6 Hz), 6H, 2 CH₃_{Leu}].

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 175,72 y 174,97 (C), 173,56, 173,48, 173,17, 173,14, 173,0 (C), 172,88, 172,85 y 172,27 (C), 159,13, 155,52 y 155,01 (C), 81,59 y 80,78 (C), 66,39, 66,09 y 65,25 (CH), 58,89 y 58,46 (CH), 54,69 y 54,6 (CH₂), 54,14, 53,80 y 53,38 (CH₂), 53,74, 52,78 y 52,31 (CH), 43,46 y 42,03 (CH), 42,33, 42,27 y 42,21 (CH₂), 41,43 y 40,61 (CH₂), 32,78 y 31,68 (CH₂), 28,58 y 28,55 (3 CH₃), 25,53, 25,35, 24,85, 23,79, 23,26 y 22,37 (CH), 21,55 y 21,31 (2 CH₃).

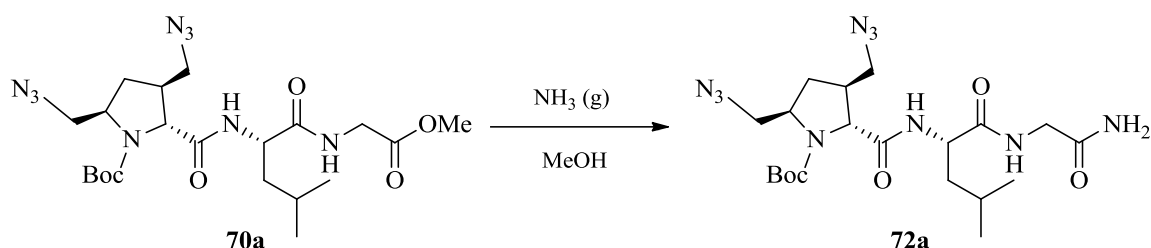
EM-IE-TDV *m/z* (%): 518,2 [(M + Na)⁺, 100]

Microanálisis. Calculado para C₂₀H₃₃N₉O₆ (495,53): C 48,48, H 6,71, N 25,44. Encontrado: C 48,82, H 7,01, N, 25,63.





3.45. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicinamida (**72a**)



Sobre una disolución de **70a** (0,11 g, 0,22 mmol) en MeOH (10 mL) enfriada mediante un baño de hielo, se hizo pasar una corriente de NH₃ (g) hasta saturación del sistema. La mezcla de reacción resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. La eliminación de los disolventes a vacío mediante coevaporación con CH₂Cl₂ (3 × 10 mL) para la completa eliminación del NH₃ en exceso, condujo a **72a** (0,10 g, 94%) como un sólido blanco, p.f. = 67–70°C.

$[\alpha]_D^{25} = -27,20$ (*c* 0,87, MeOH).

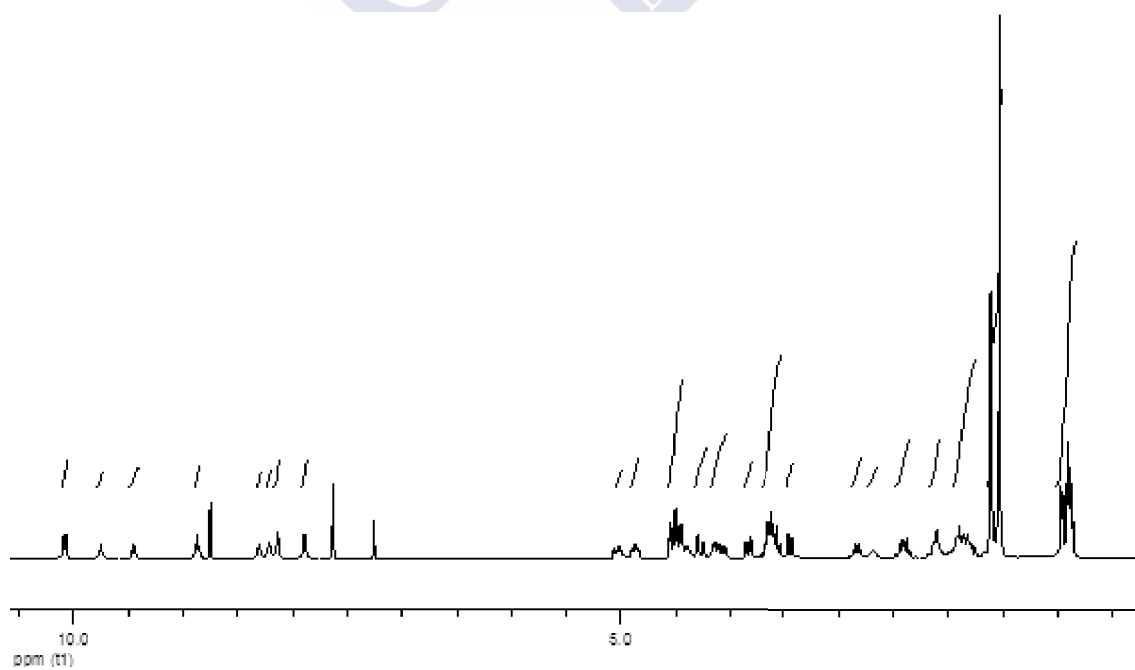
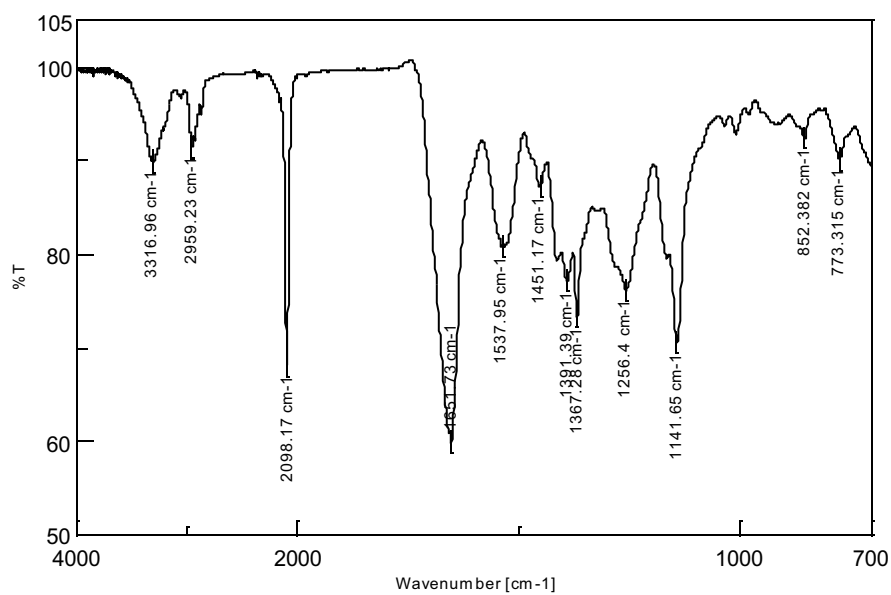
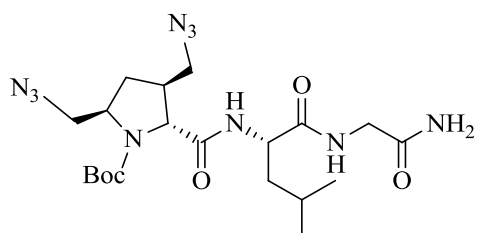
IR ν (cm⁻¹): 3317, 2959, 2098, 1652, 1537, 1391, 1367, 1256, 1167, 1142.

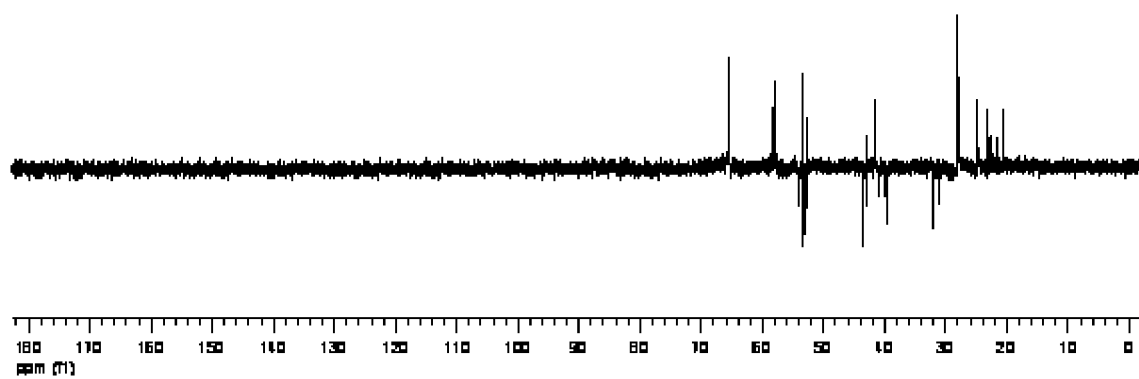
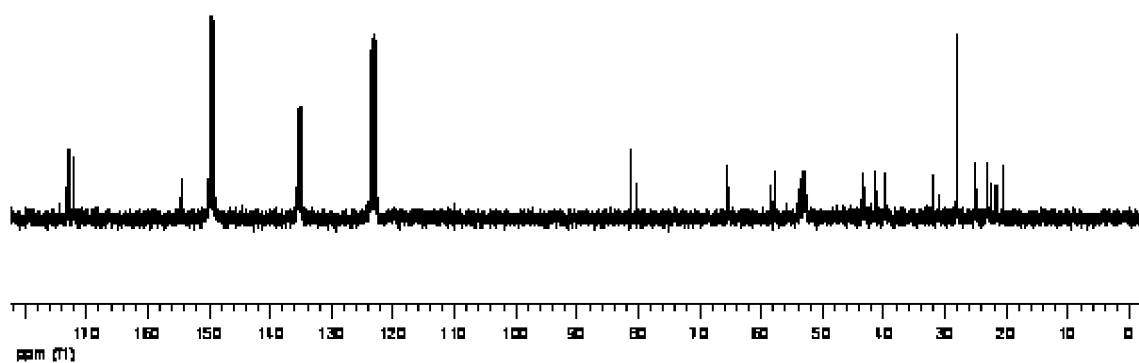
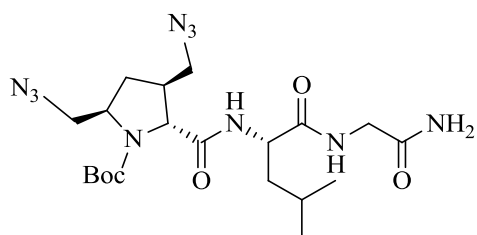
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [10,10 (d, *J* = 6,9 Hz), 9,79 (t, *J* = 5,6 Hz), 9,45 (d, *J* = 7,2 Hz) y 8,87 (t, *J* = 6,1 Hz), 2H, intercambian con D₂O, 2 NH], 8,22, 8,20, 8,13 y 7,89, (4 s an, 2H, intercambian con D₂O, NH₂), 5,02-4,96 y 4,90-4,84 (2 m, 1H), 4,57-4,36 (m, 2H), 4,28 (dd, *J* = 16,8, 5,5 Hz, 1H), 4,15-3,99 (m, 1H), 3,83 y 3,44 (2 dd, *J* = 12,4, 5,5 Hz y *J* = 12,4, 1,9 Hz, 1H), 3,68-3,49 (m, 3H), 2,85-2,78 y 2,68-2,66 (2 m, 1H), 2,46-2,31-(m, 1H), 2,16-2,03 (m, 1H), 1,99-1,77 (m, 3H), 1,61 y 1,53 (2 s, 9H, 3 CH₃), [0,96 (d, *J* = 5,9 Hz), 0,91 (d, *J* = 5,9 Hz), 0,87 (d, *J* = 5,9 Hz), 6H, 2 CH₃_{Leu}].

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 173,28 y 173,18 (C) 173,08 y 172,88 (C), 172,15 y 172,01 (C), 154,84 y 154,42 (C), 81,34 y 80,39 (C), 65,60 y 65,41 (CH), 58,29 y 57,84 (CH), 54,0, 53,48, 53,03 y 52,84 (2 CH₂), 53,30 y 52,72 (CH), 43,53 y 43,02 (CH₂), 42,94 y 41,52 (CH), 41,02 y 39,77 (CH₂), 32,08 y 31,04 (CH₂), 28,11 y 28,0 (3 CH₃), 24,98 y 24,78 (CH), 23,10, 22,60, 21,68 y 20,63 (2 CH₃).

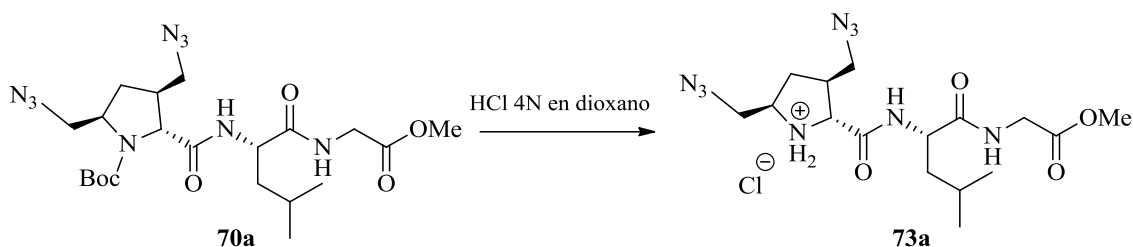
EM-IE-TDV *m/z* (%): 517,26 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₂₀H₃₄N₁₀O₅ (494,55): C 48,57, H 6,93, N 28,32. Encontrado: C 48,82, H 7,01, N, 28,64.





3.46. Clorhidrato de D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicinato de metilo (**73a**)



Una disolución de **70a** (60 mg, 0,12 mmol) HCl 4N en dioxano (2 mL) se dejó reaccionar durante 3 h a temperatura ambiente. La eliminación de los disolventes a vacío mediante coevaporación con CH_2Cl_2 (3×5 mL), condujo a **73a** (50 mg, 95%) como un sólido blanco, de bajo punto de fusión.

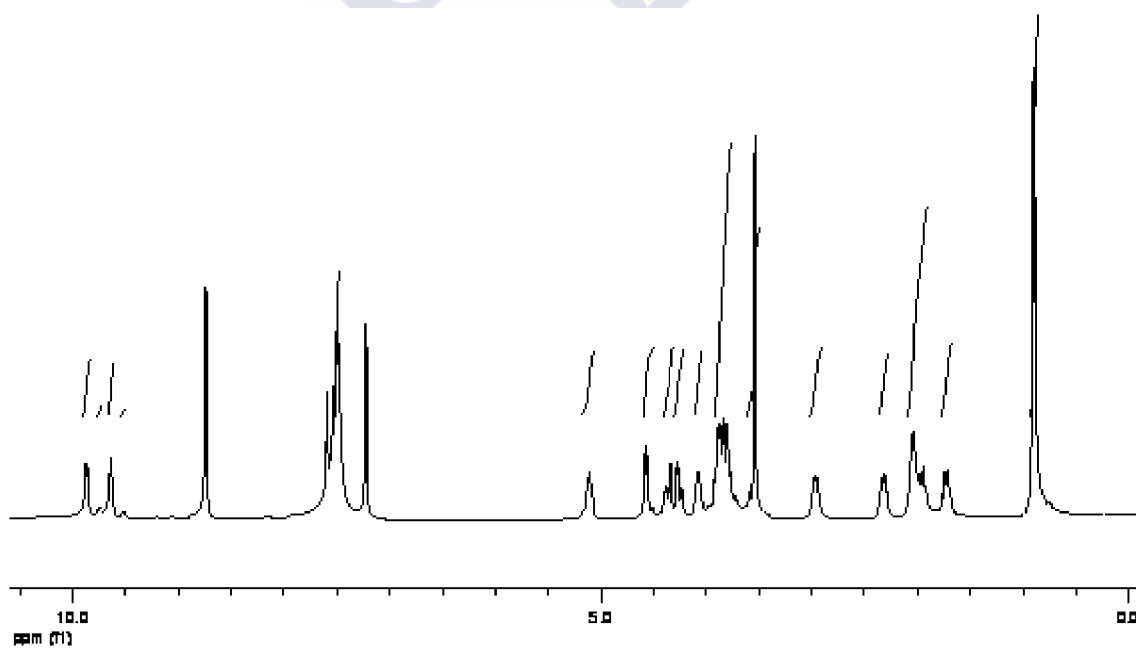
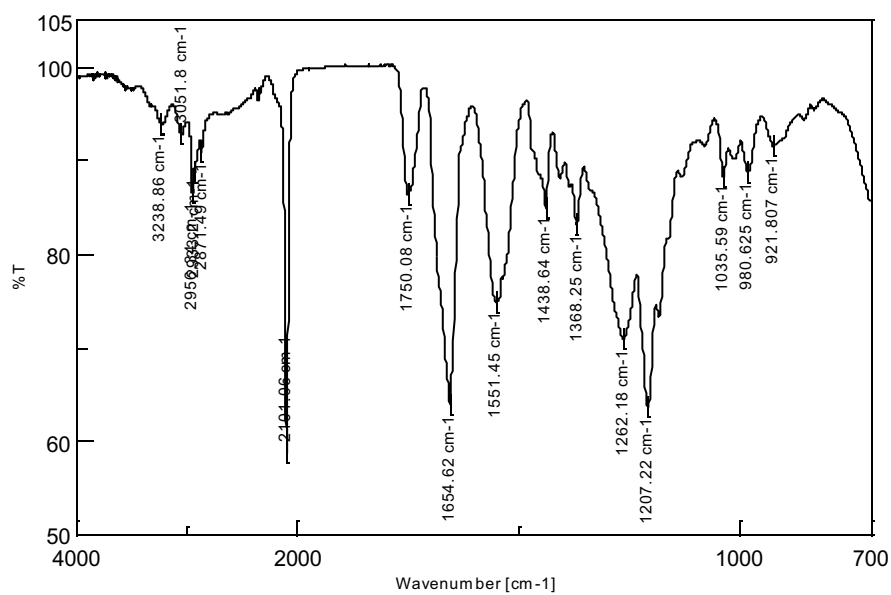
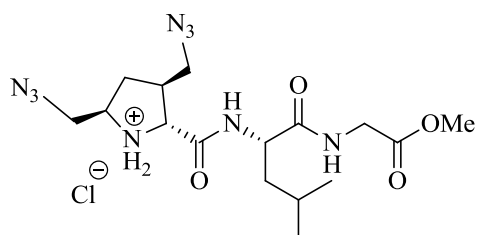
$[\alpha]_D^{25} = -70,05$ (c 1,01, MeOH).

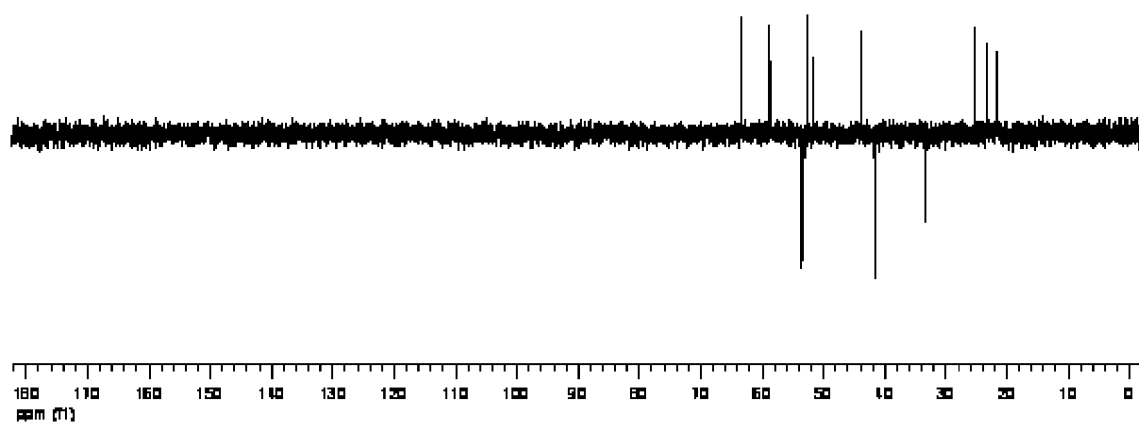
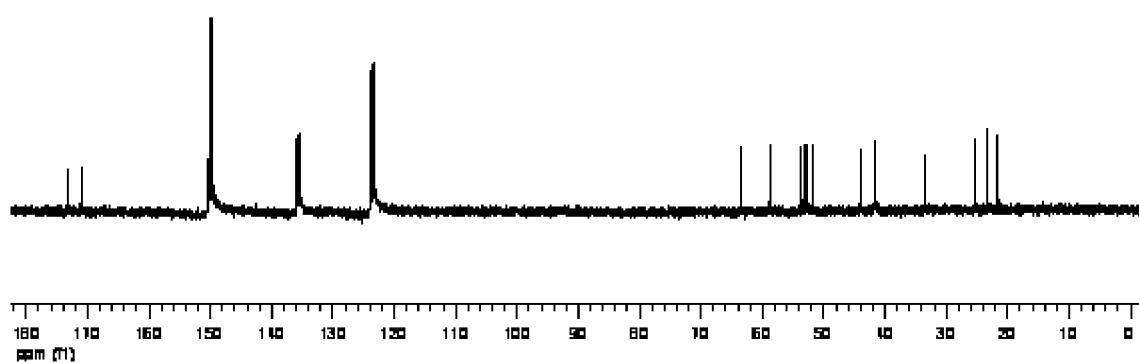
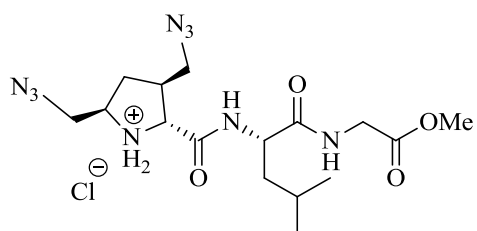
IR ν (cm^{-1}): 3239, 2956, 2101, 1750, 1655, 1551, 1368, 1262, 1207.

^1H RMN (piridina- d_5) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [9,87 (d, $J = 7,8$ Hz), 9,75 (d, $J = 7,8$ Hz), 9,64 (s an) y 9,52 (s an), 2H, intercambian con D_2O , 2 NH], 7,50 (s an, 2H, intercambian con D_2O , $^+\text{NH}_2$), 5,11 (s an, 1H), 4,59-4,57 y 4,52-4,50 (2 m, 1H), 4,36 (dd, $J = 16,8, 5,5$ Hz, 1H), 4,25 (dd, $J = 16,8, 5,1$ Hz, 1H), 4,12-4,01 (m, 1H), 3,97-3,72 (m, 4H), 3,59 y 3,54 (2 s, 3H, CO_2CH_3), 2,98-2,93 (m, 1H), 2,36-2,29 (m, 1H), 2,06-1,92 (m, 3H), 1,77-1,69 (m, 1H), 0,90 (d, $J = 3,9$ Hz, 6H, 2 CH_3_{Leu}).

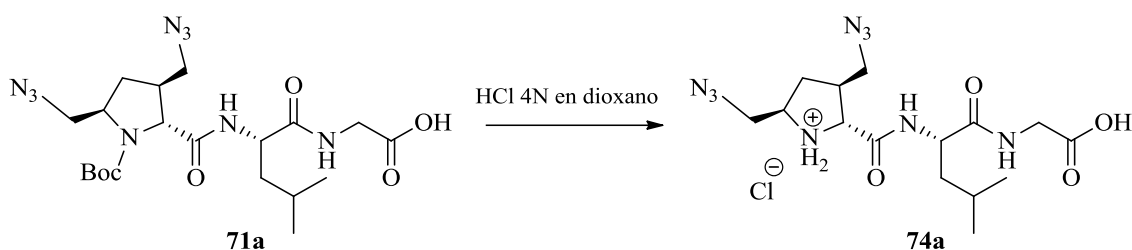
^{13}C RMN (piridina- d_5) δ (ppm): 173,27 (C), 170,91 (C), 170,86 (C), 63,57 (CH), 58,73 (CH), 53,62 (CH_2), 53,20 (CH_2), 52,64 (CH_3), 51,77 (CH), 43,92 (CH), 41,61 (CH_2), 41,54 (CH_2), 33,48, (CH_2), 25,21 (CH), 23,27 y 21,59 (2 CH_3).

EM-AR (IE-TDV) m/z : Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_9\text{O}_4$: 410,2259. Encontrado: 410,2255.





3.47. Clorhidrato de D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicina(74a)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **73a** (véase apartado 3.46) hemos obtenido **74a** a partir de **71a** (50 mg, 0,10 mmol) como un sólido beige (42 mg, 96%) de bajo punto de fusión.

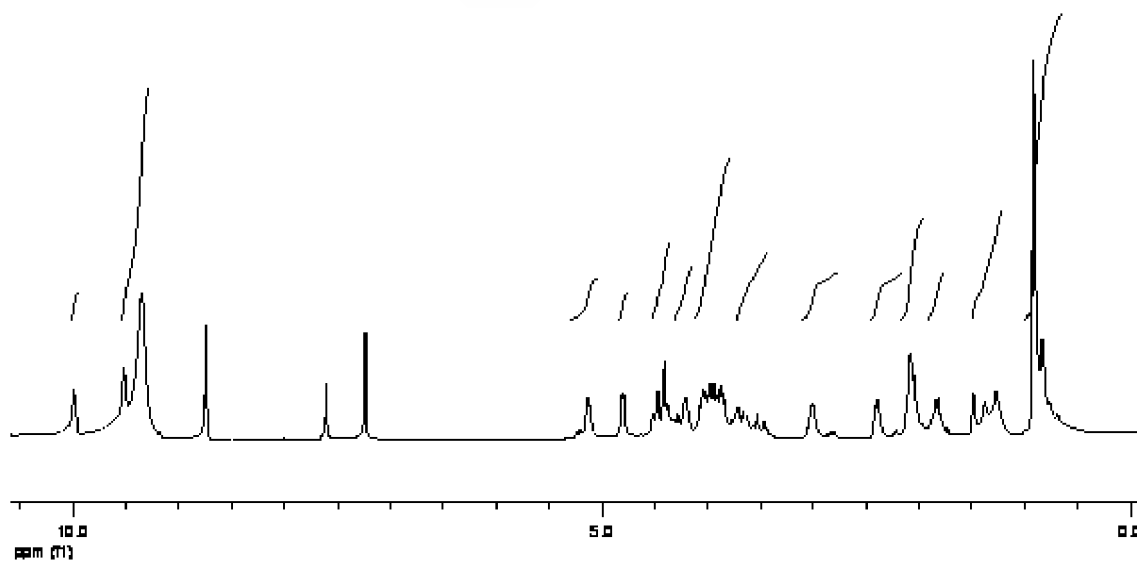
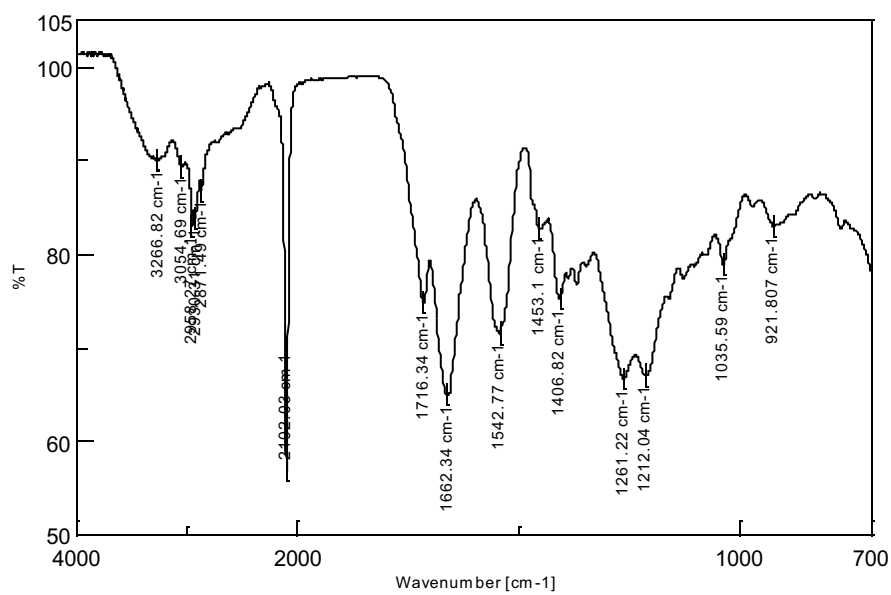
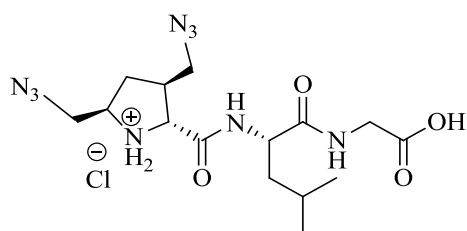
$[\alpha]_D^{25} = -38,51$ (c 1,01, MeOH).

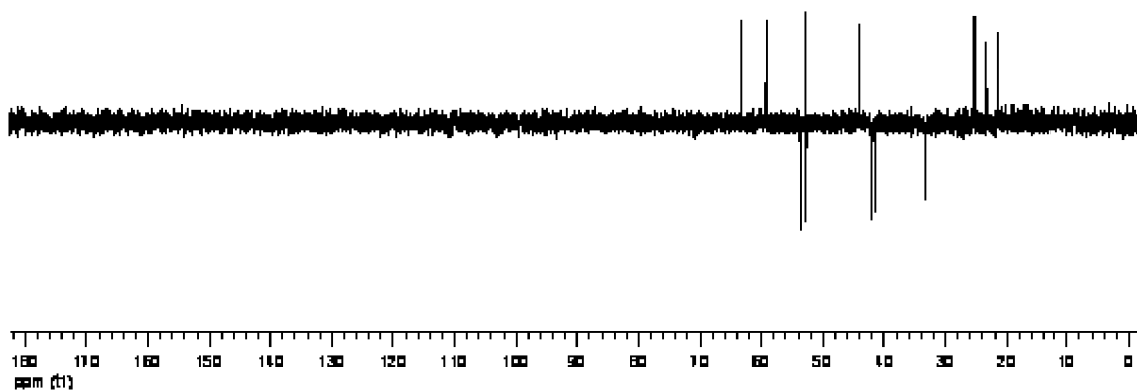
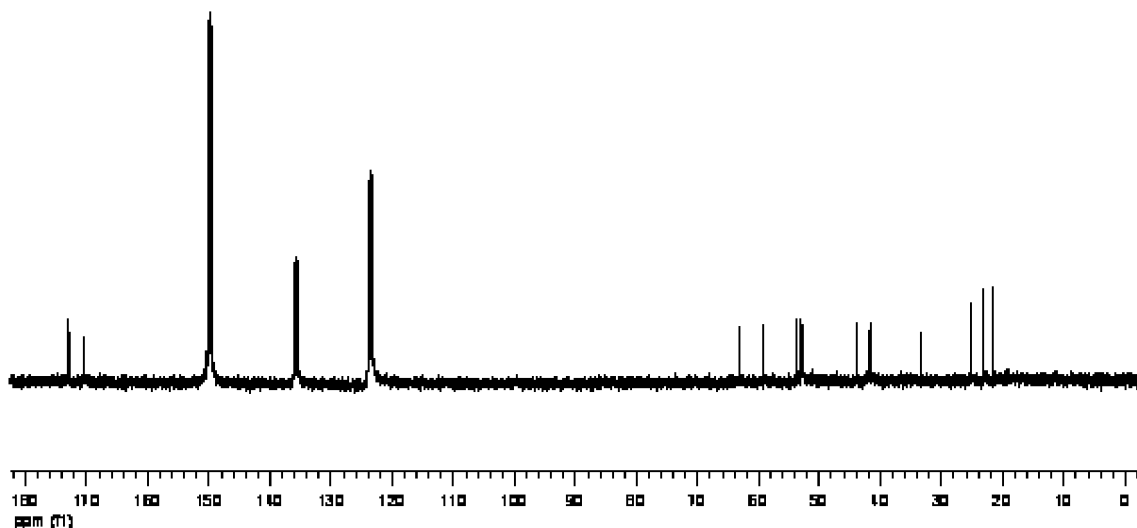
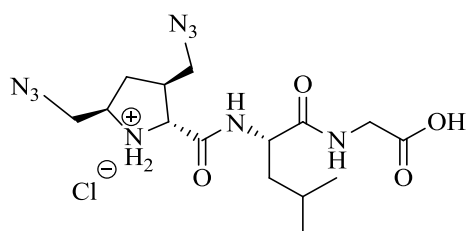
IR v (cm⁻¹): 3267, 3055, 2958, 2102, 1716, 1662, 1543, 1407, 1261, 1212, 1036.

¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [9,98 (d, $J = 7,8$ Hz), 9,51 y 9,35 (2 s an), 5H, intercambian con D₂O, 2 NH, ⁺NH₂, y CO₂H], 5,24-5,11 (m, 1H), [4,80 (d, $J = 6,3$ Hz), 4,50 (dd, $J = 17,2, 5,4$ Hz), 4,40 (dd, $J = 17,6, 5,1$ Hz), 2H], 4,33-4,21 (m, 1H), 4,08-3,84 (m, 3H), 3,77-3,43 (m, 1H), 3,06-2,79 (m, 1H), 2,41-2,20 (m, 1H), 2,09-2,02 (m, 2H), 1,89-1,79 (m, 1H), 1,49-1,27 (m, 2H), [0,92 (s an) y 0,84-0,82 (m), 6H, 2 CH₃Leu].

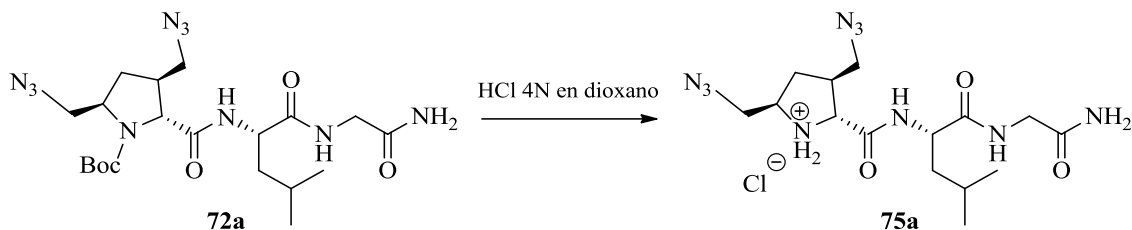
¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 173,17 (C), 172,89 (C), 170,42 (C), 63,26 (CH), 59,23 (CH), 53,65 (CH₂), 52,96 (CH), 52,76 (CH₂), 43,97 (CH), 42,06 (CH₂), 41,58 (CH₂), 33,38 (CH₂), 25,27 (CH), 23,33 y 21,61 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₁₅H₂₆N₉O₄: 396,2103. Encontrado: 396,2108.





3.48. Clorhidrato de D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicinamida (75a)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **73a** (véase apartado 3.46) hemos obtenido **75a** a partir de **72a** (40 mg, 0,08 mmol) como un sólido beige claro (34 mg, 98%) de bajo punto de fusión.

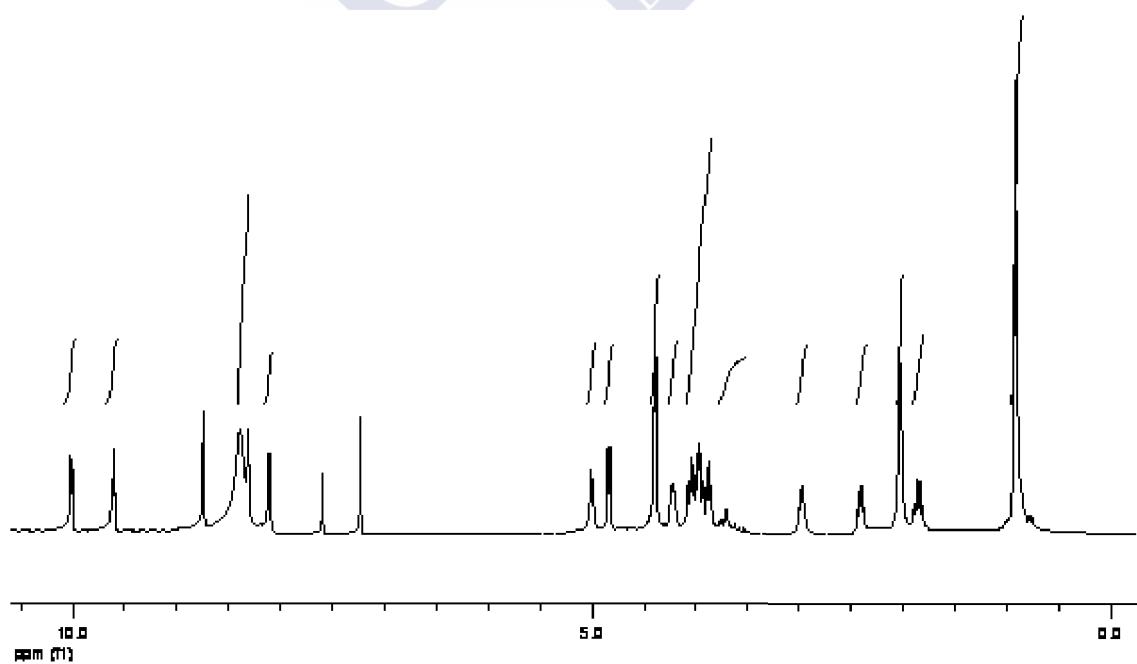
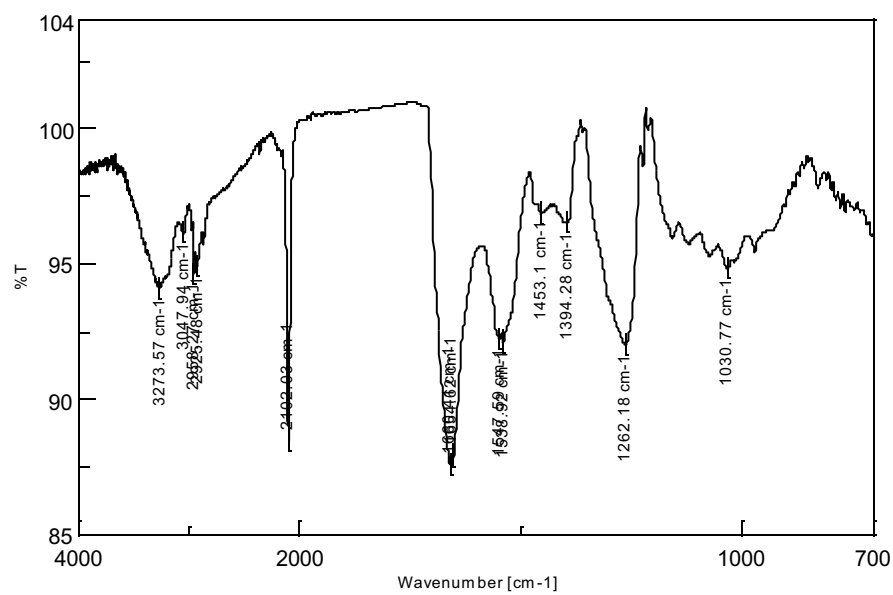
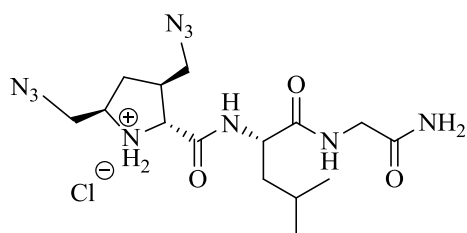
$[\alpha]_D^{25} = -30,95$ (c 1,05, MeOH).

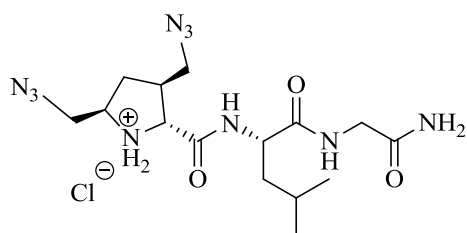
IR v (cm⁻¹): 3273, 2958, 2102, 1660, 1655, 1548, 1539, 1262, 1031.

¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 10,02-10,0 (m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 9,63-9,59 (m, 1H, intercambia con D₂O, NH), 8,38, 8,31 y 8,10 (3 s an, 4H, intercambian con D₂O, NH₂ y ⁺NH₂), 5,03-5,0 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4,84 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 2-H_{Pro}), 4,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H, 2-H_{2Gly}), 4,26-4,19 (m, 1H), 4,08-3,85 (m, 4H), 3,82-3,62 (m, 1H), 3,05-2,94 (m, 1H, 4-HH_{Pro}), 2,44-2,37 (m, 1H, 4-HH_{Pro}), 2,13-1,96 (m, 2H, 3-H_{2Leu}), 1,93-1,78 (m, 1H, 4-H_{Leu}), 0,99-0,86 (m, 6H, 2 CH_{3Leu}).

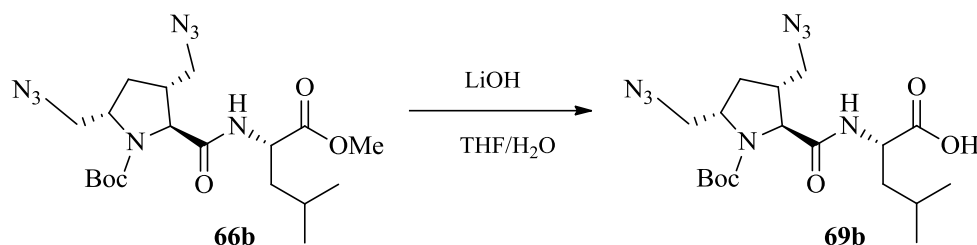
¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 173,18 (C), 172,92 (C), 170,79 (C), 63,11 (CH), 59,35 (CH), 53,57 (CH₂), 53,34 (CH), 52,62 (CH₂), 43,96 (CH), 43,55 (CH₂), 41,23 (CH₂), 33,34 (CH₂), 25,29 (CH), 23,31 y 21,59 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₁₅H₂₇N₁₀O₃: 396,2263. Encontrado: 395,2273.





3.49. L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucina (**69b**)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **63** (véase apartado 3.34) a partir de **66b** (0,23 g, 0,51 mmol) tras 3,5 h de reacción y elaboración habitual, se obtuvo **69b** como un sólido blanco (0,20 g, 90%), p.f. = 47–49 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +11,30$ (*c* 1,0, MeOH).

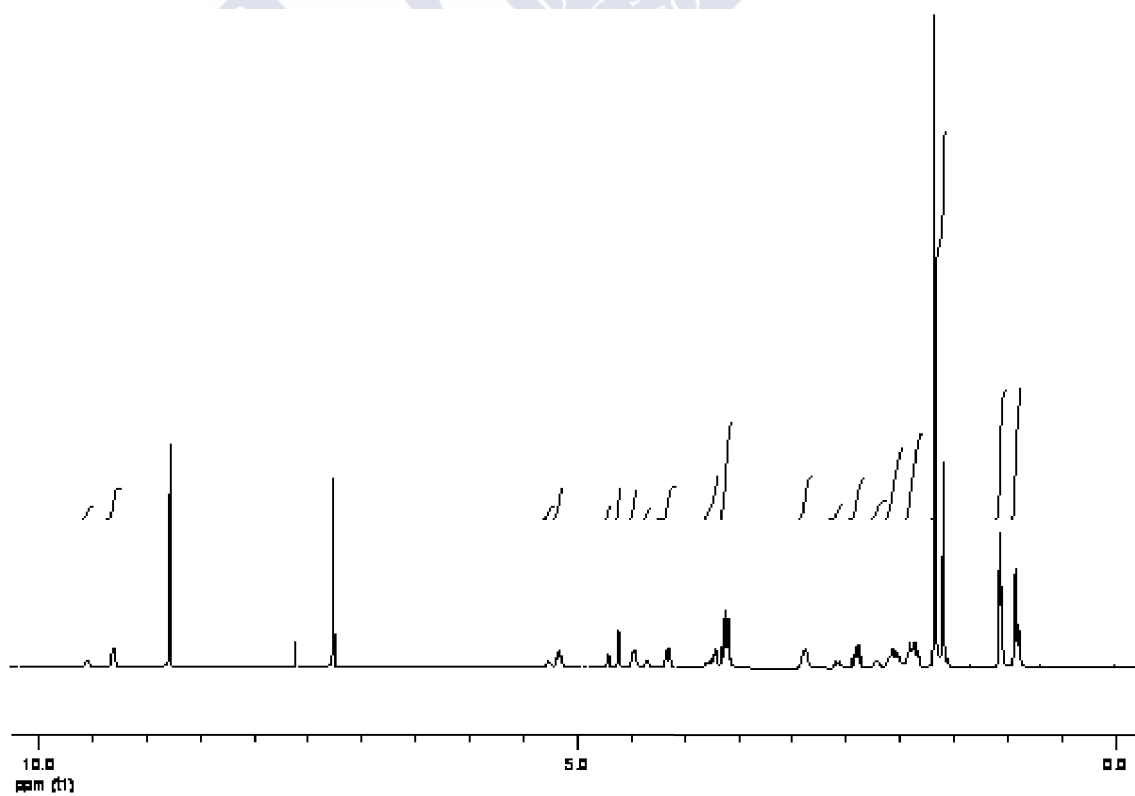
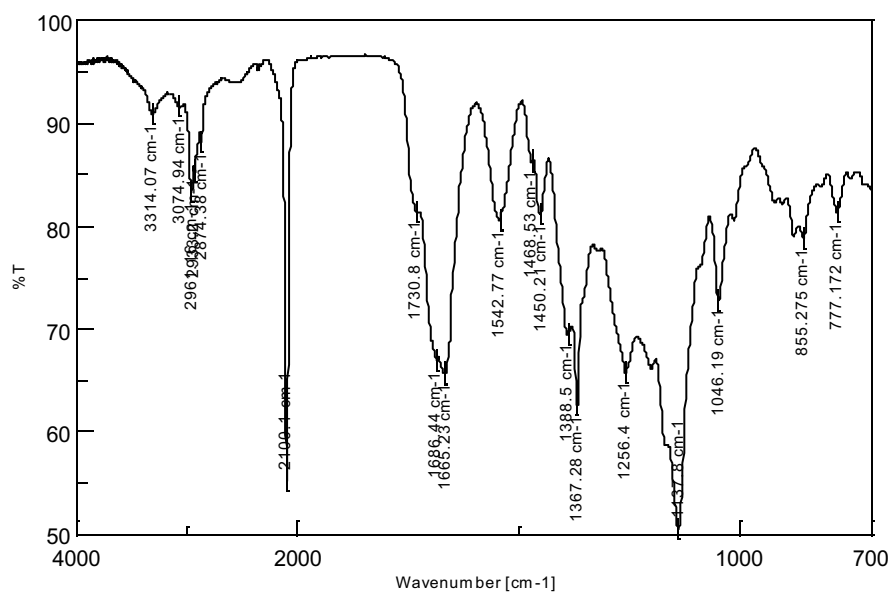
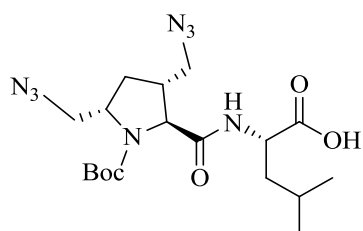
IR v (cm⁻¹): 3314, 2961, 2100, 1731, 1686, 1665, 1542, 1388, 1367, 1256, 1138, 855.

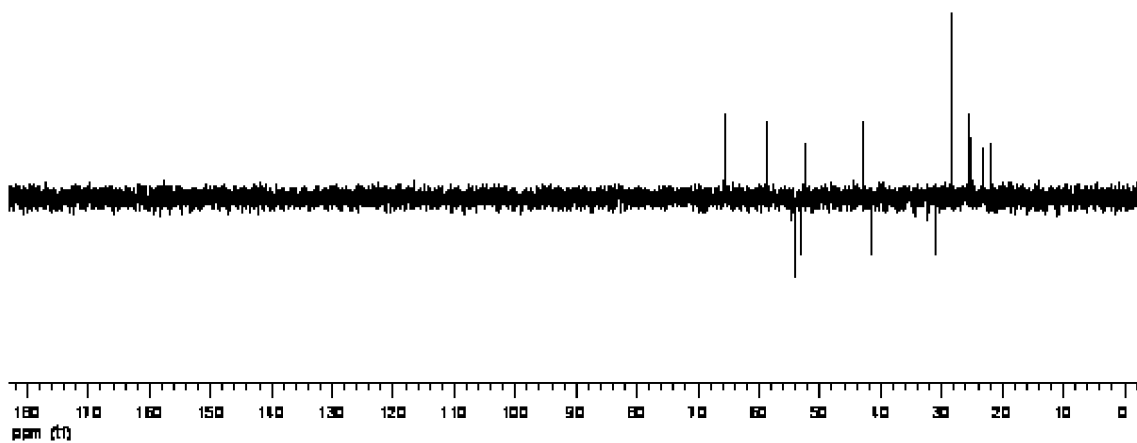
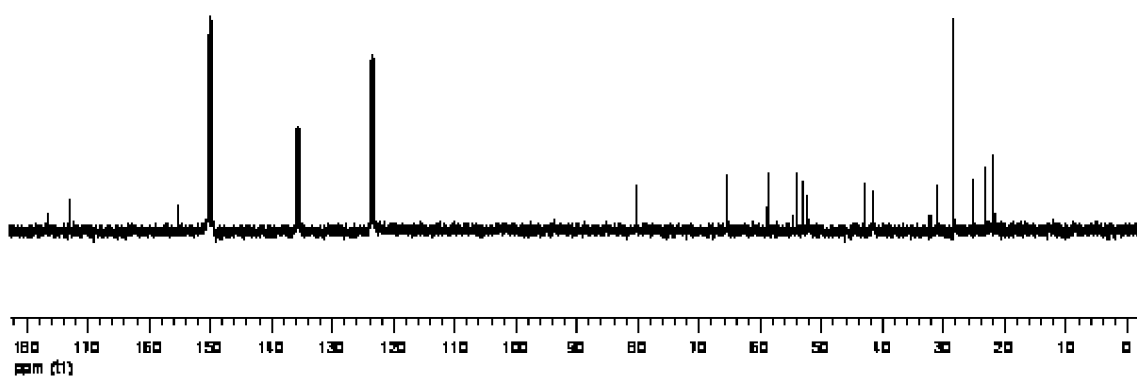
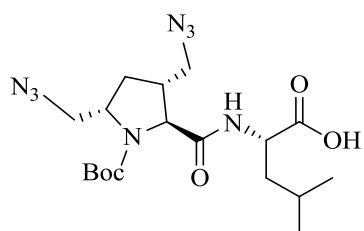
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [9,54 (d, *J* = 7,9 Hz) y 9,30 (d, *J* = 7,3 Hz), 1H, intercambia con D₂O, NH], 5,21-5,19 y 5,17-5,14 (2 m, 1H), 4,73-4,70 y 4,63-4,60 (2 m, 1H), 4,49-4,46 y 4,37-4,33 (2 m, 1H), 4,16 (dd, *J* = 12,2, 5,8, Hz, 1H), [3,78-3,70, 3,65-3,57 [(2 m, se simplifican al tratar con D₂O a 2 dd centrados a 3,93 (*J* = 12,1, 5,5 Hz), y 3,70 (*J* = 12,1, 8,2 Hz)] y 3,51-3,54 (m), 3H], 2,91-2,85 (m, 1H), [2,58-2,51 (m), 2,40 (dt, *J* = 13,2, 8,3 Hz) y 2,21-2,19 (m), 2H, uno de ellos intercambia con D₂O, CO₂H], 2,09-2,0 (m, 2H), 1,91-1,81 (m, 2H), 1,68 y 1,60 (2 s, 9H, 3 CH₃), [1,08-1,05 (m, se simplifica al tratar con D₂O a un d centrado a 0,98 (*J* = 6,2 Hz), 0,93 y 0,89 (2 d, *J* = 5,4 Hz y *J* = 5,9 Hz), 6H, 2 CH₃_{leu}].

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 176,54 (C), 173,03 (C), 155,31 (C), 80,32 (C), 65,52 (CH), 58,78 (CH), 54,58 y 54,07 (CH₂), 53,12 (CH₂), 52,32 (CH), 42,90 (CH), 41,52 (CH₂), 32,25 y 31,15 (CH₂), 28,45 (3 CH₃), 25,31 (CH), 23,19 y 21,80 (2 CH₃).

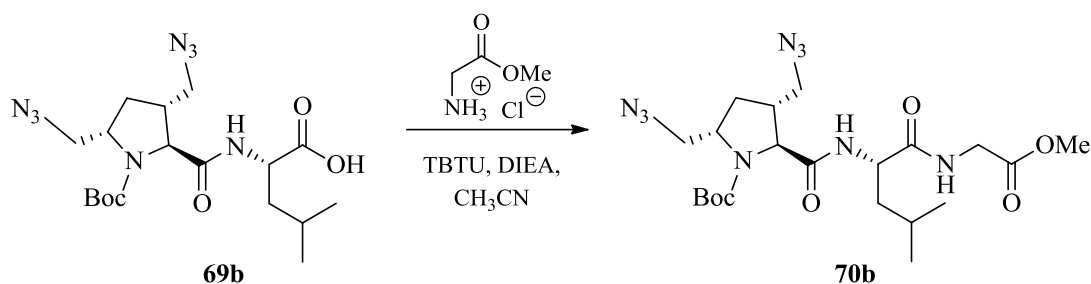
EM-IE-TDV *m/z* (%): 461,2 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₁₈H₃₀N₈O₅ (438,48): C 49,30, H 6,90, N 25,55. Encontrado: C 49,67, H 7,25, N, 25,61.





3.50. L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicinato de metilo (70b**)**



Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.40, hemos obtenido **70b** a partir de **69b** (150 mg, 0,34 mmol) en CH₃CN seco (10 mL) y clorhidrato del glicinato de metilo (51,5 mg, 0,41 mmol) tras 17 h de reacción, seguidas de la elaboración habitual, se aisló un sólido blanquecino (170 mg) que fue sometido a fraccionamiento por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente hexano/AcOEt (1:3). La eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto, condujo a **70b** (150 mg, 86%) como un sólido blanco, p.f. = 119–120 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -17,0$ (*c* 0,99, MeOH).

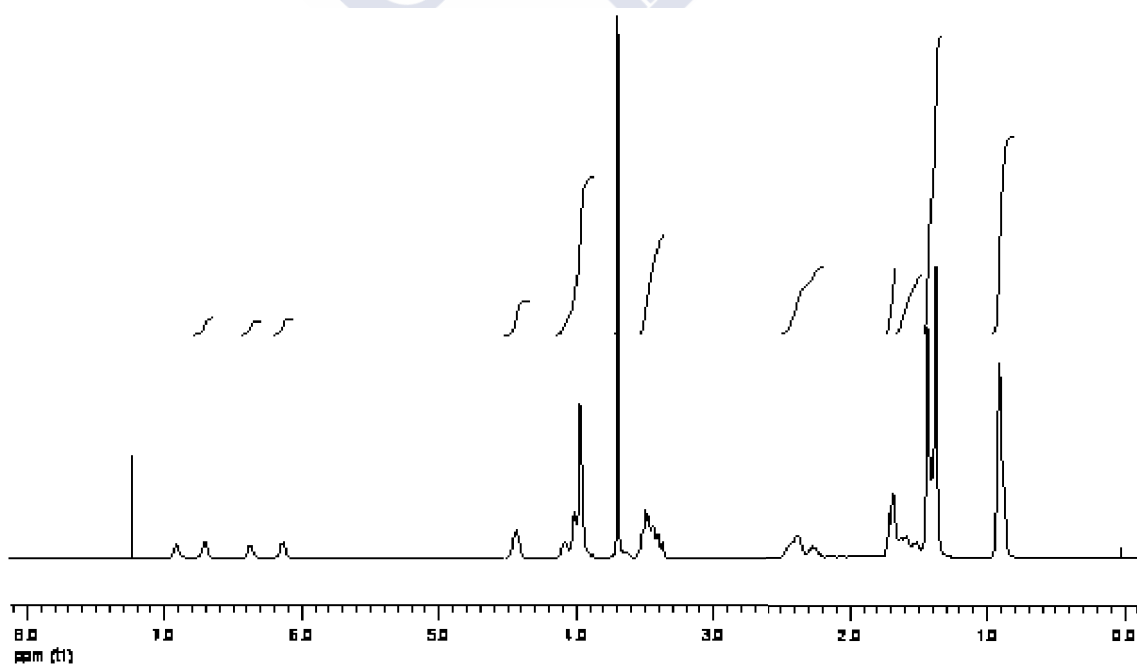
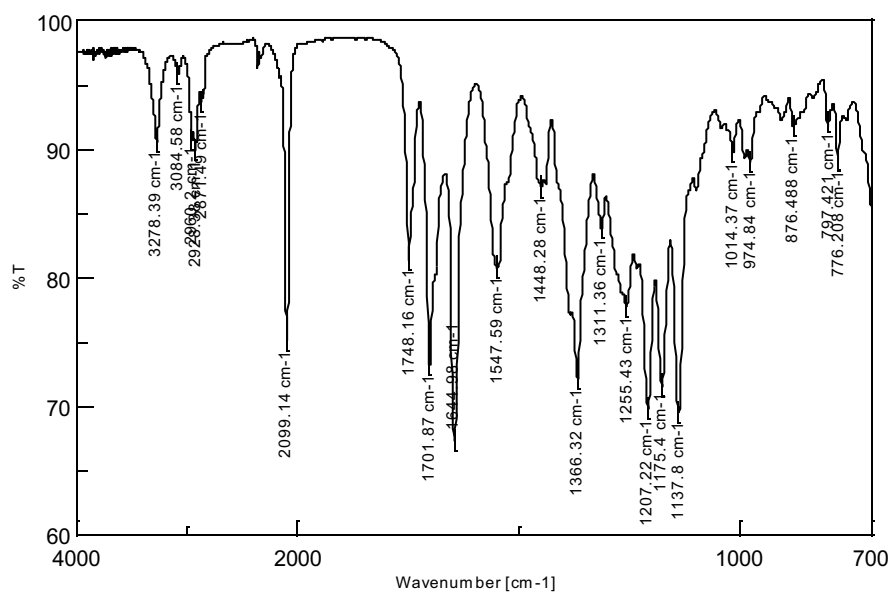
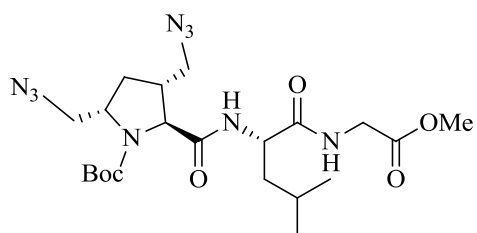
IR v (cm⁻¹): 3278, 2960, 2928, 2099, 1748, 1702, 1645, 1548, 1448, 1366, 1255, 1207, 1175, 1138, 776.

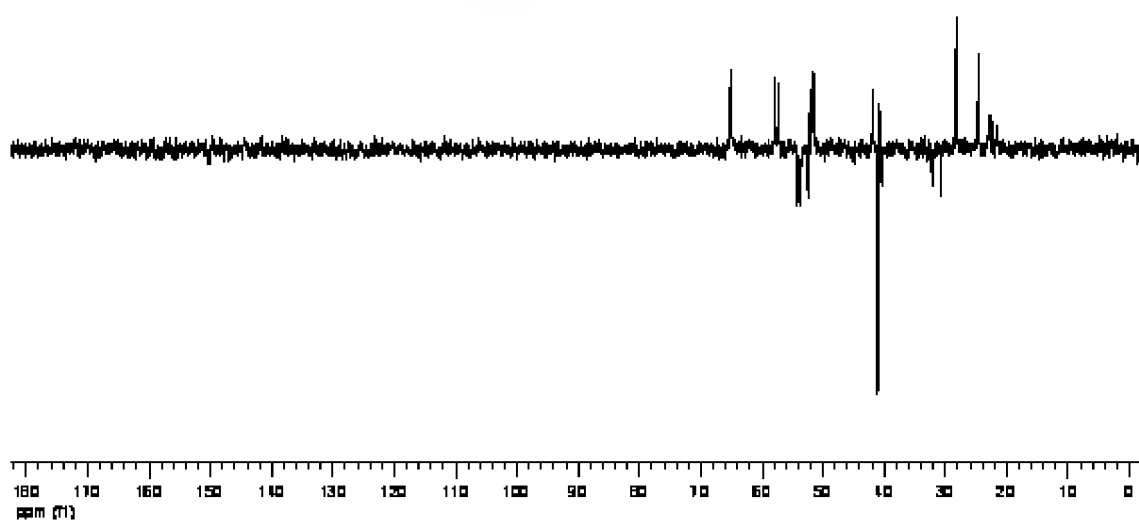
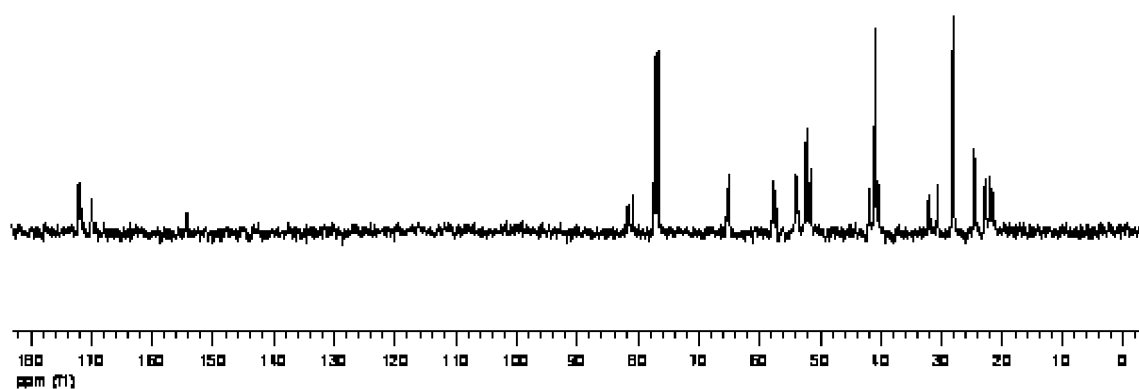
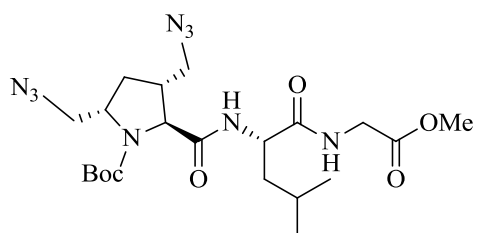
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 6,91 y 6,70 (2 s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 6,37 y 6,13 (2 d, *J* = 6,8 Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,47-4,42 (m, 1H), 4,11-3,89 (m, 5H), 3,72 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,52-3,39 (m, 3H), 2,44-2,37 y 2,28 -2,24 (2 m), 2H), 1,76-1,70 (m, 2H), 1,64-1,53 (m, 2H), 1,41 y 1,46 (2 s, 9H, 3 CH₃), 0,94 (s an, 6H, 2 CH₃Leu).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 172,14 y 172,07 (C), 171,86 (C), 169,93 (C), 154,32 y 154,19 (C), 81,65 y 80,87 (C), 65,42 y 65,05 (CH), 57,83 y 57,31 (CH), 54,16 y 53,80 (CH₂), 52,46 (CH₂) 52,27 (CH), 51,82 y 51,51 (CH₃), 41,96 y 40,73 (CH), 41,04 y 40,38 (CH₂), 32,14 (CH₂), 30,72 (CH₂), 28,15 (3 CH₃), 24,64 (CH), 23,0, 22,72, 22,18 y 21,63, (2 CH₃).

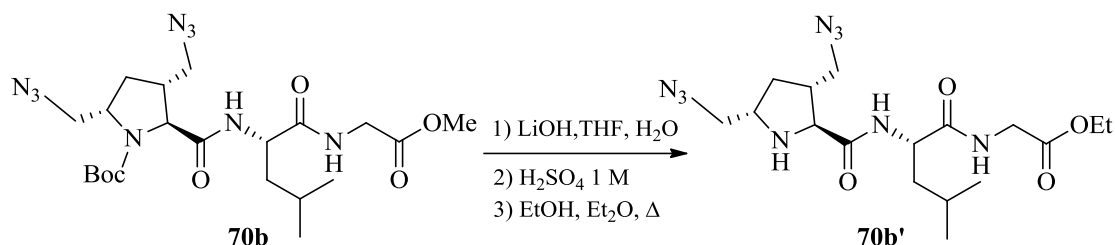
EM-IE-TDV *m/z* (%): 532,3 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₂₁H₃₅N₉O₆ (509,50): C 49,50, H 6,92, N 24,74. Encontrado: C 49,79, H 7,46, N, 25,03.





3.51. L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidometil)prolin-L-leucilglicinato de etilo (70b')



Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.33, a partir de **70b** (80 mg, 0,16 mmol), tras 24 h de reacción, y elaboración habitual se obtuvo un residuo aceitoso (70 mg) que sometido a fraccionamiento mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, CH₂Cl₂/MeOH (20:1), aislándose tras la eliminación del disolvente de las fracciones que contenían producto **70b'** (50 mg, 76%) como un aceite amarillo denso.

$[\alpha]_D^{25} = +6,14$ (*c* 1,01, MeOH).

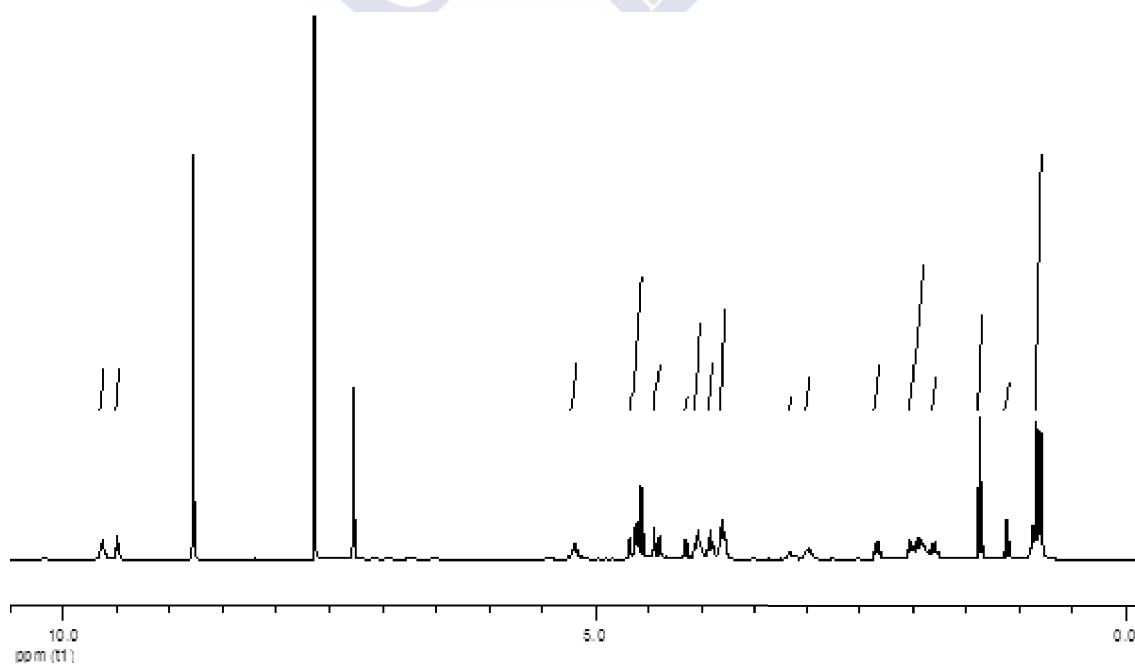
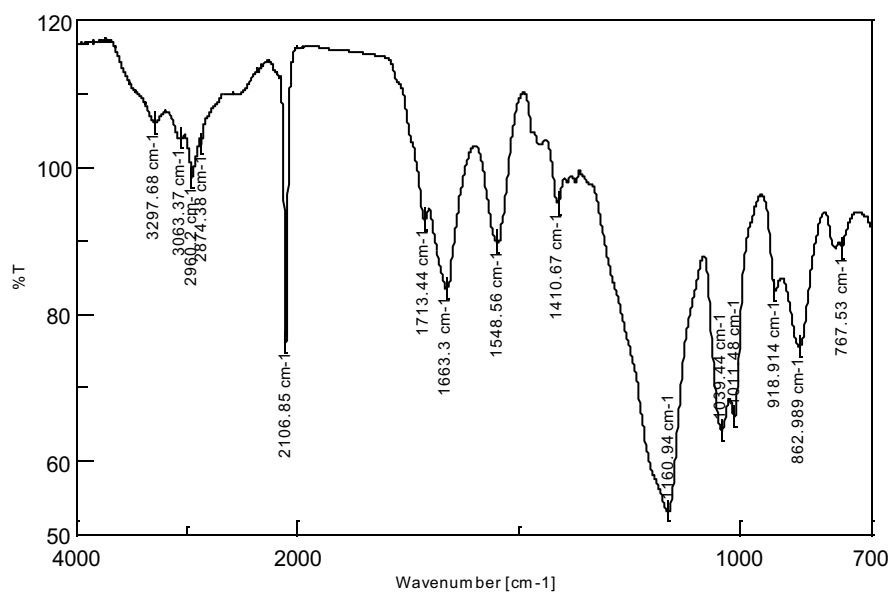
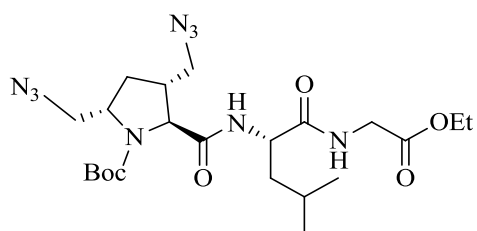
IR ν (cm⁻¹): 3298, 3063, 2960, 2107, 1713, 1664, 1548, 1411, 1207, 1175, 1161, 1039, 1011, 863, 767.

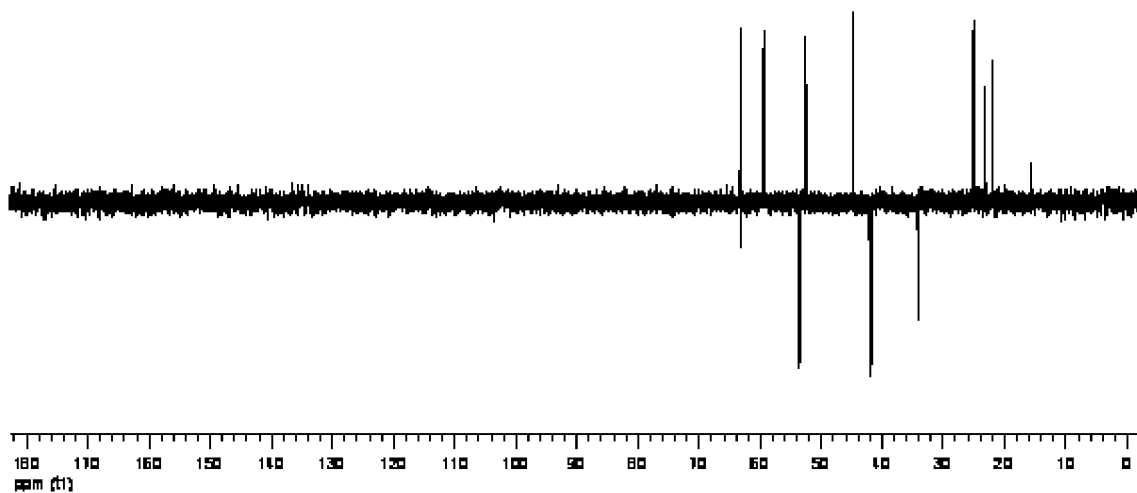
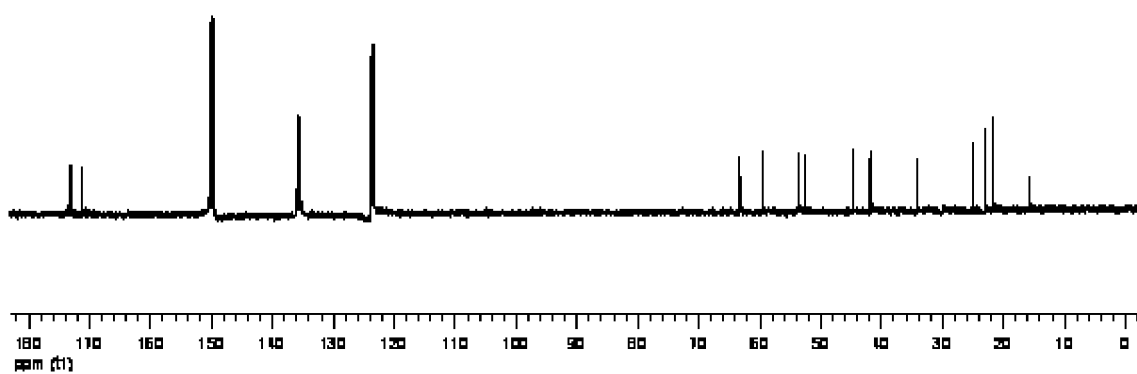
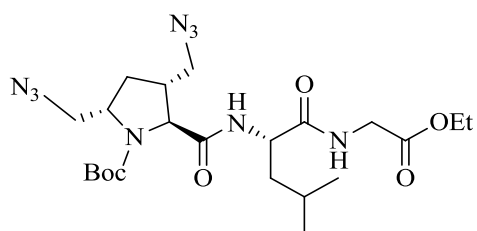
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 9,64 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 9,49 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 5,22-5,16 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4,68- 4,54 (m, 3H), 4,45-4,40 (m, 1H), 4,17-4,12, 4,07-4,0, 3,99-3,89, y 3,82-3,78 (4 m, 6H, uno de ellos intercambia con D₂O, NH), 3,15-3,09 y 3,02-2,94 (2m, 1H), 2,37-2,31 (m, 1H), 2,05-1,87 y 1,81-1,78 (2 m, 4H), 1,37 y 1,12 (2 t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0,89-0,86 (m, 1H), 0,82 (dd, *J* = 14,2, 6,4 Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu}).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 173,36 (C), 172,90 (C), 171,32 (C), 63,36 (CH), 63,23 (CH₂), 59,44 (CH), 53,72 (CH₂), 53,50 (CH₂), 52,57 (CH), 44,83 (CH), 42,06 (CH₂), 41,73 (CH₂), 34,18 (CH₂), 25,04 (CH), 23,14 (CH₃), 21,81 (CH₃), 15,69 (CH₃).

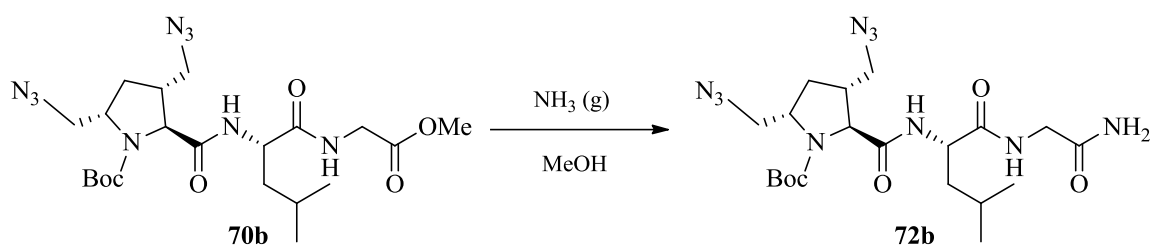
EM-IE-TDV *m/z* (%): 424,18 [(*M* + 1)⁺, 27], 410,10 (100).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₁₇H₂₉N₉O₄: 423,2343. Encontrado: 423,2359.





3.52. L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-leucilglicinamida (72b)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **72a** (véase apartado 3.45), a partir de **70b** (60 mg, 0,12 mmol) se obtuvo **72b** (56 mg, 97%) como un sólido blanco, p.f. = 60–62 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +12,60$ (*c* 1,02, MeOH).

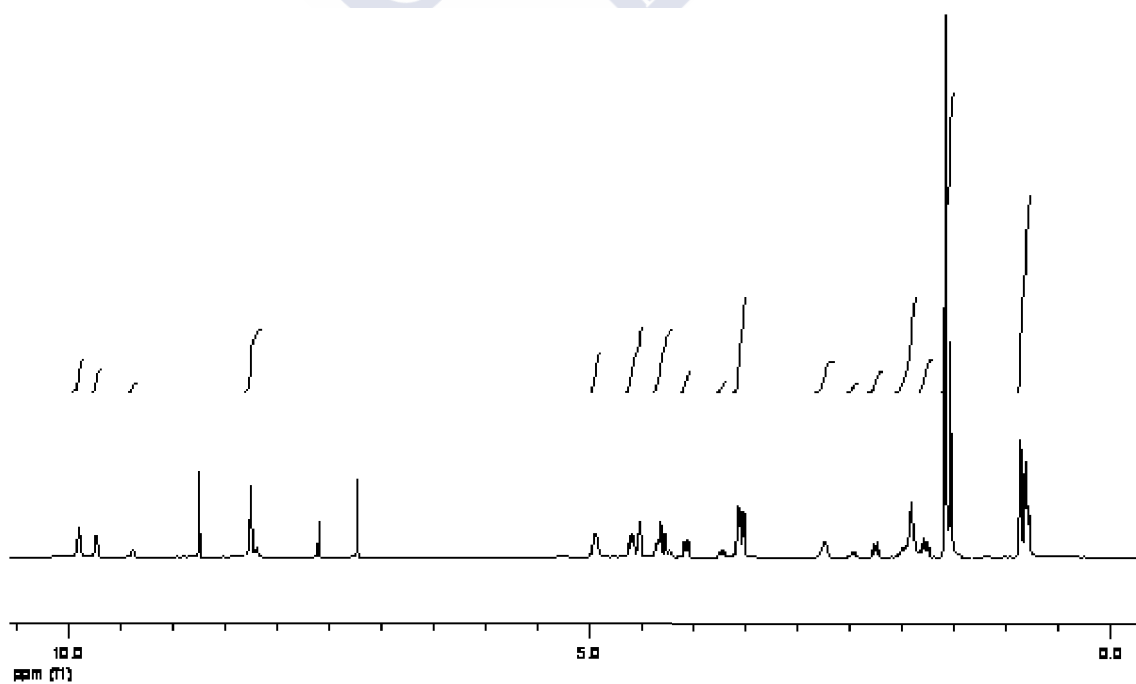
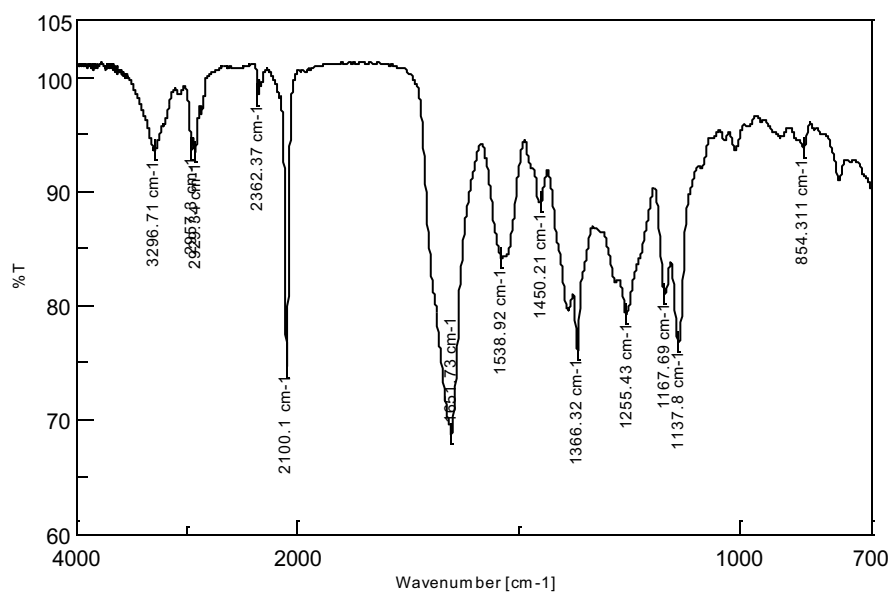
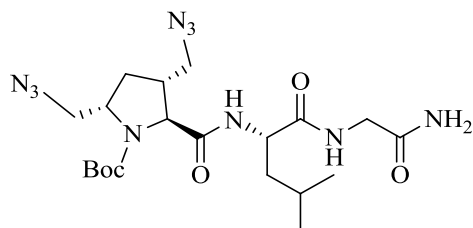
IR v (cm⁻¹): 3297, 2957, 2929, 2100, 1652, 1539, 1450, 1366, 1255, 1138, 776.

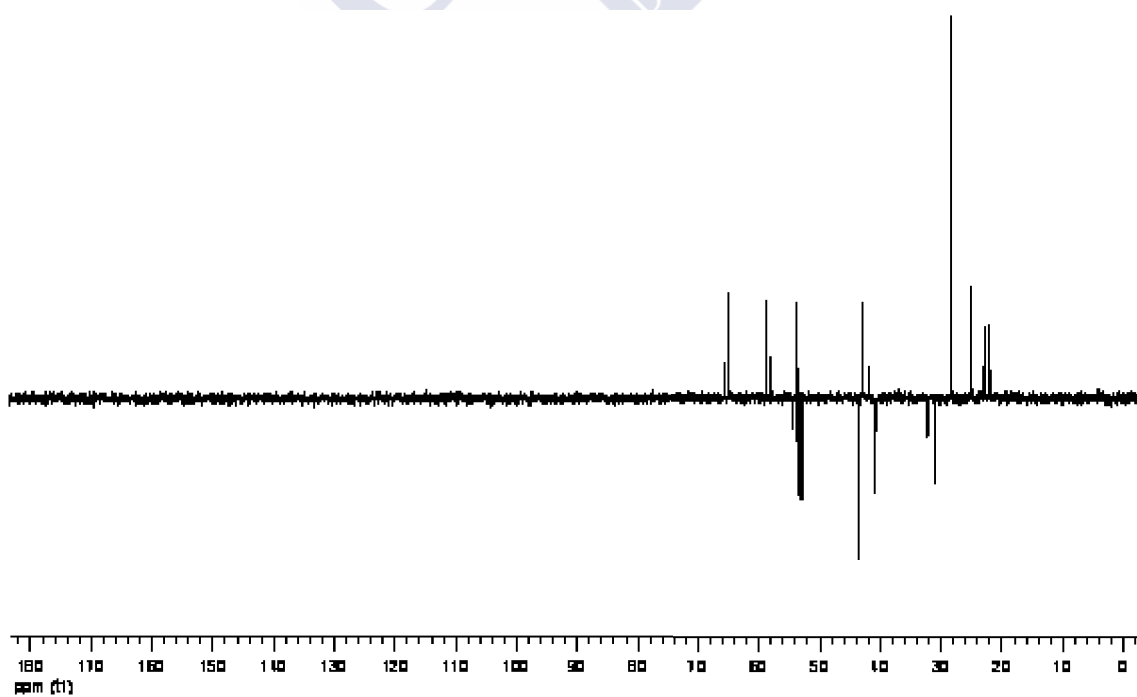
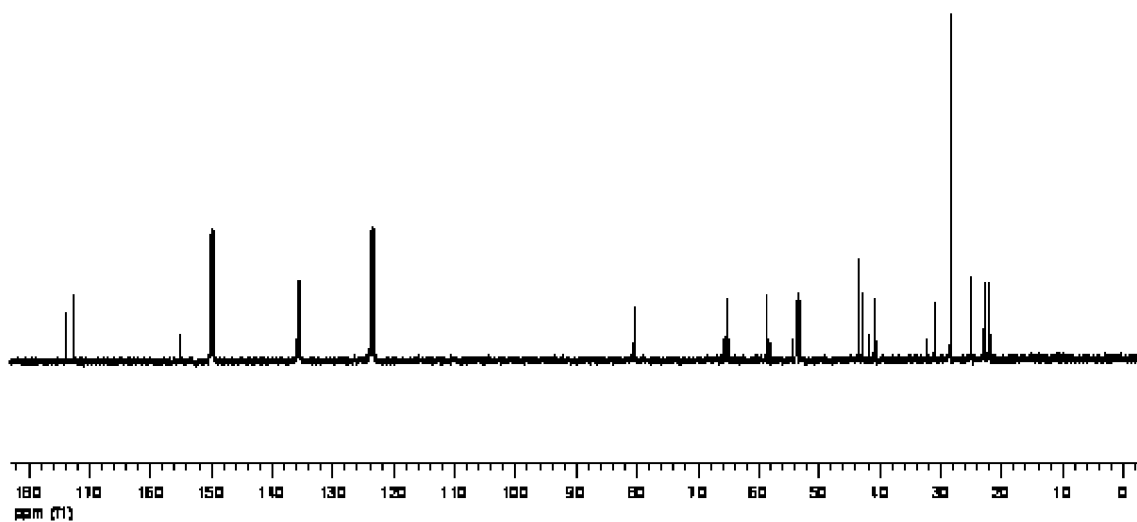
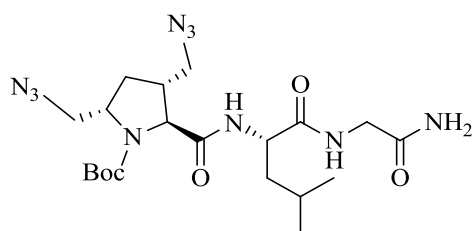
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [9,89 (s,an), 9,72 (d, *J* = 6,3 Hz) y 9,37 (s an), 2H, intercambian con D₂O, 2 NH], 8,24 y 8,19 (2 s an, 2H, intercambian con D₂O, NH₂), 4,97-4,93 (m, 1H, NHCH_{Leu}), 4,63-4,51 (m, 2H, CH₂Gly), 4,35-4,21 (m, 2H), [4,07 (dd, *J* = 12,5, 5,5 Hz) y 3,73 (dd, *J* = 11,7, 6,3 Hz), 1H], 3,58-3,51 (m, 3H), 2,76-2,71 (m, 1H), [2,49-2,46 (m) y 2,25 (dt, *J* = 13,3, 7,8 Hz), 1H], 2,0-1,90 (m, 3H), 1,86-1,74 (m, 1H), 1,59 y 1,54 (2 s, 9H, 3 CH₃), 0,87-0,78 (m, 6H, 2 CH₃Leu).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 174,04 (C), 173,98 y 173,68 (C), 172,49 (C), 155,07 (C), 88,82 y 80,35 (C), 65,71 y 65,08 (CH), 58,76 y 58,15 (CH), 54,43, 53,80, 53,51 y 52,98 (2 CH₂), 53,67 (CH), 43,52 (CH₂), 42,84 y 41,86 (CH), 40,93 y 40,68 (CH₂), 31,19 y 31,06 (CH₂), 28,42 (3 CH₃), 25,02 (CH), 23,11, 22,87, 22,03 y 21,86 (2 CH₃).

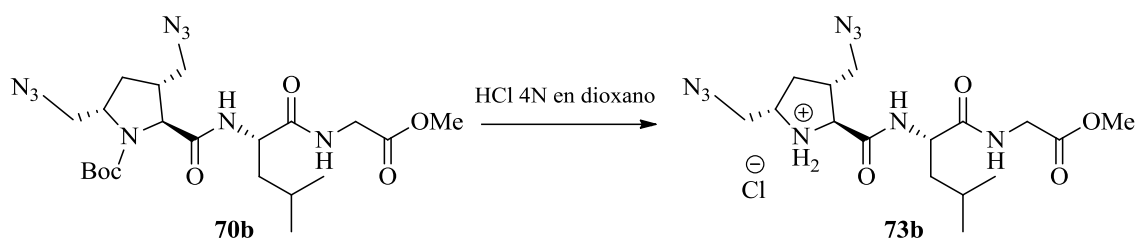
EM-IE-TDV *m/z* (%): 517,26 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₂₀H₃₄N₁₀O₅ (494,55): C 48,57, H 6,93, N 28,32. Encontrado: C 48,82, H 7,26, N, 28,56.





3.53. Clorhidrato de L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-leucilglicinato de metilo (73b)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **73a** (véase apartado 3.46) hemos obtenido **73b** a partir de **70b** (40 mg, 0,08 mmol) como un sólido blanco (34 mg, 97%) de bajo punto de fusión.

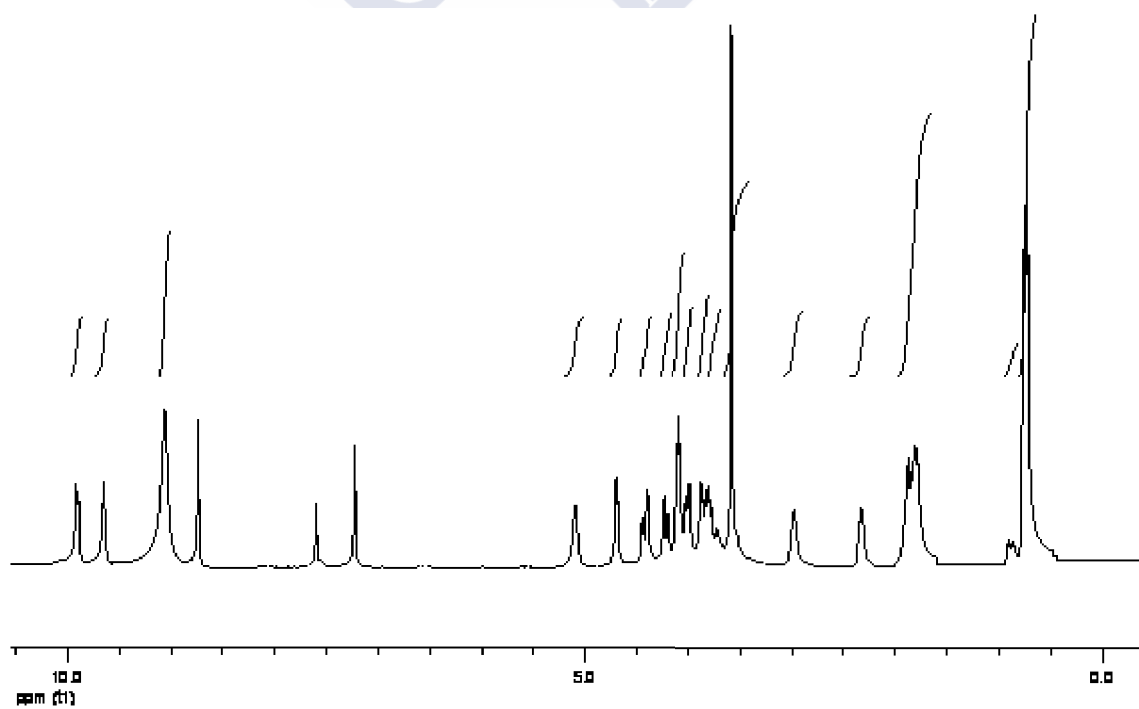
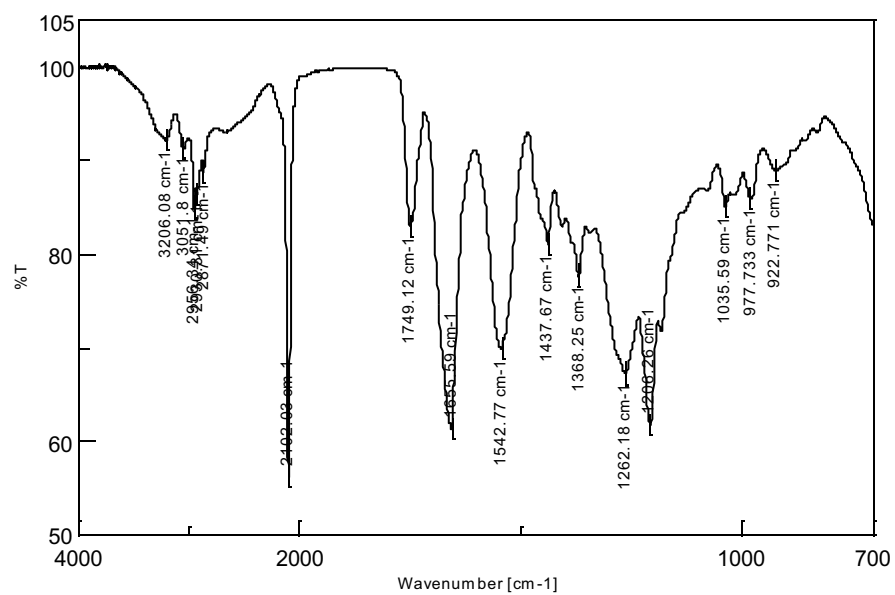
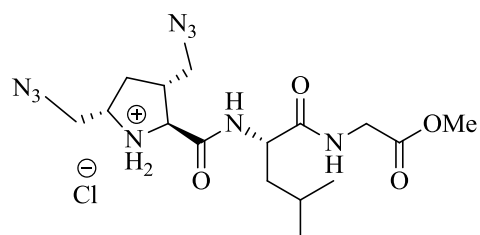
$[\alpha]_D^{25} = +10,76$ (c 1,05, MeOH).

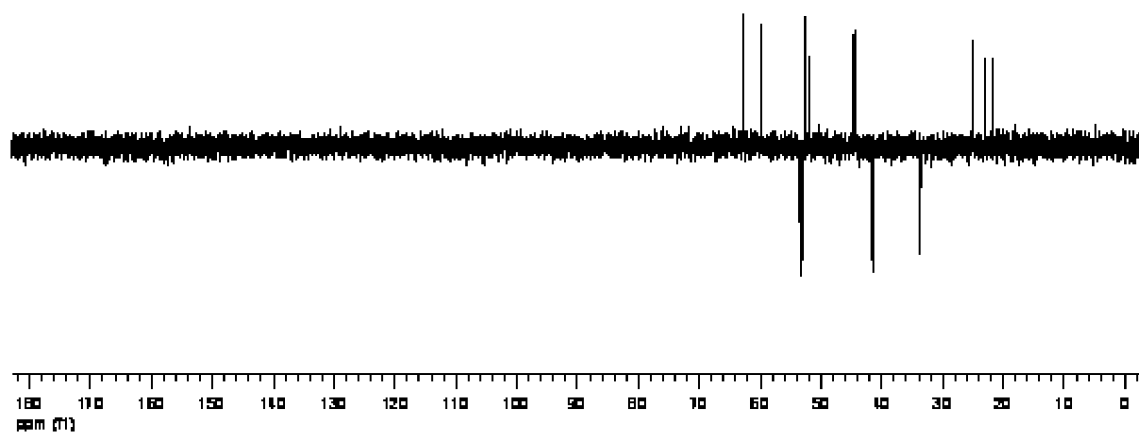
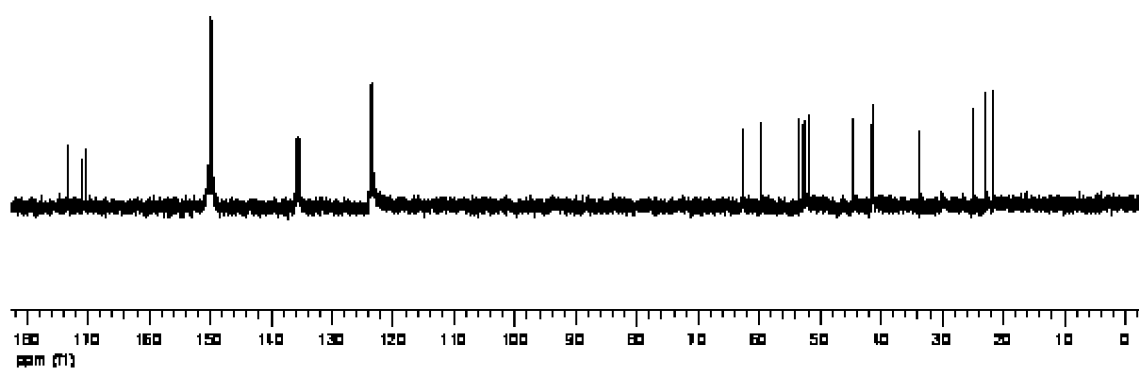
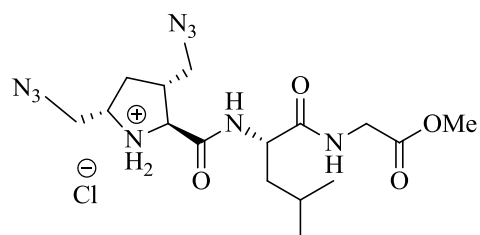
IR v (cm⁻¹): 3206, 2956, 2102, 1749, 1656, 1543, 1368, 1262, 1206.

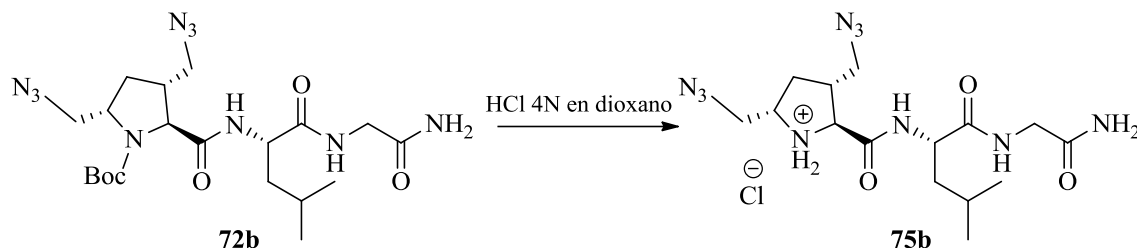
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [9,90 (d, $J = 7,8$ Hz) y 9,64 (s an), 2H, intercambian con D₂O, 2 NH], 9,05 (s an, 2H, intercambian con D₂O, ⁺NH₂), 5,10-5,07 (m, 1H), 4,70 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 4,42 (dd, $J = 17,3, 5,4$ Hz, 1H), 4,22 (dd, $J = 17,2, 5,5$ Hz, 1H), 4,11-4,09 (m, 2H), 4,0 (dd, $J = 11,7, 5,5$ Hz, 1H), 3,84 (dd, $J = 19,9, 7,2$ Hz, 1H), 3,76 (dd, $J = 23,4, 7,8$ Hz, 1H), 3,58 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,02-2,95 (m, 1H), 2,35-2,30 (m, 1H), 1,91-1,78 (m, 4H), [0,93-0,86 (m) y 0,74 (dd, $J = 13,3, 6,1$ Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu})].

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 173,45 (C), 170,97 (C), 170,44 (C), 62,83 (CH), 59,78 (CH), 53,43 (CH₂), 52,83 (CH₂), 52,63 (CH₃), 51,89 (CH), 44,54 (CH), 41,59 (CH₂), 41,50 (CH₂), 33,71, (CH₂), 24,99 (CH), 23,05 y 21,77 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) m/z : Calculado para C₁₆H₂₈N₉O₄: 410,2259. Encontrado: 410,2262.





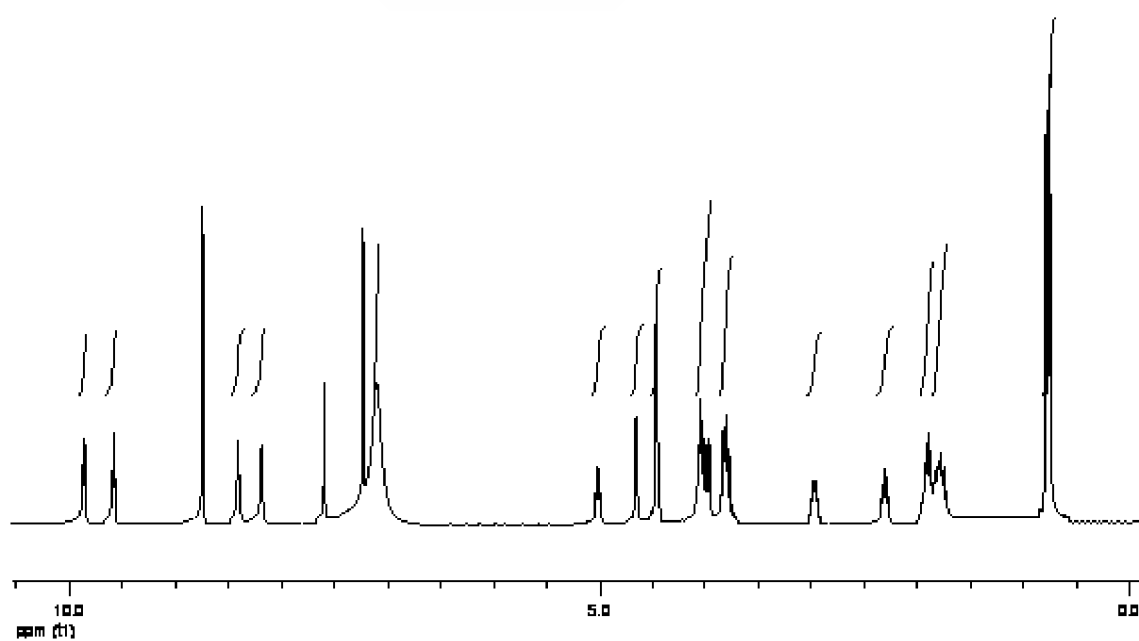
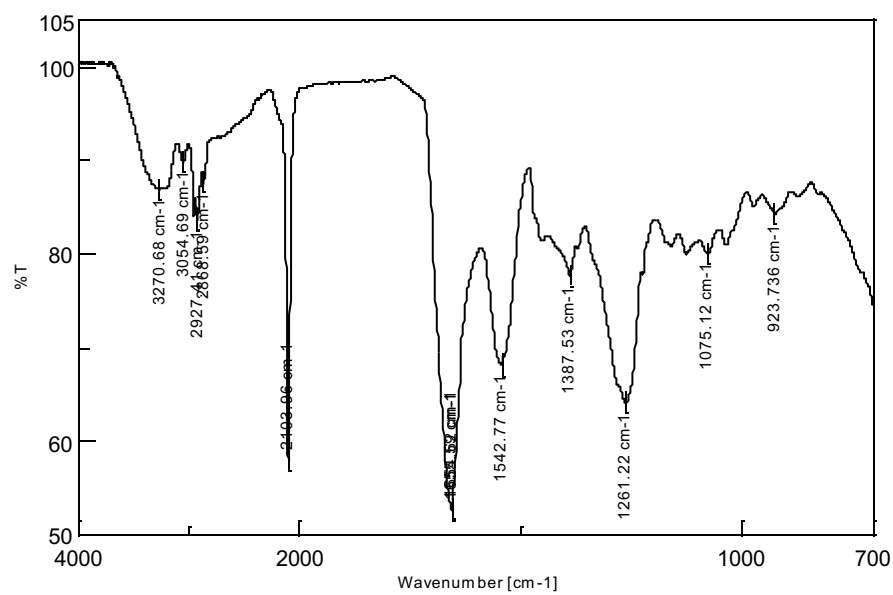
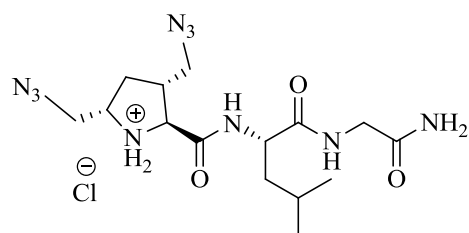

$$[\alpha]_D^{25} = +23,84 (c\ 0,99, \text{MeOH}).$$

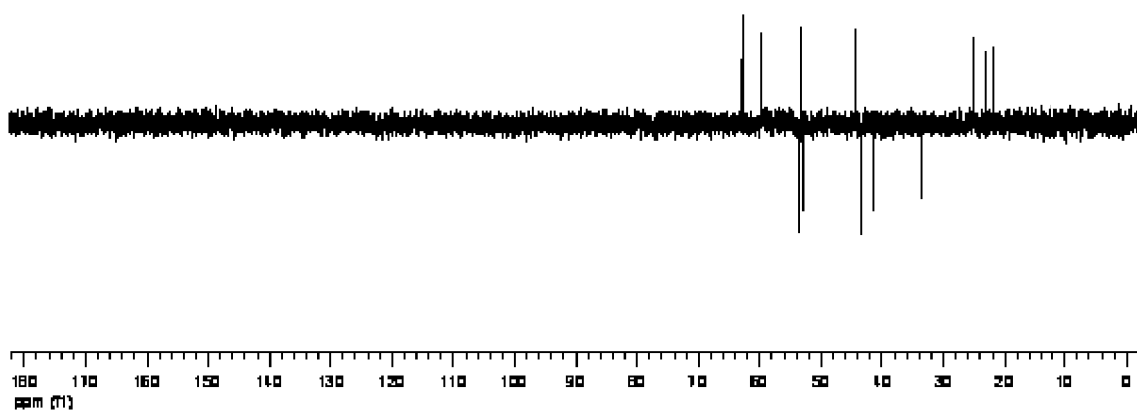
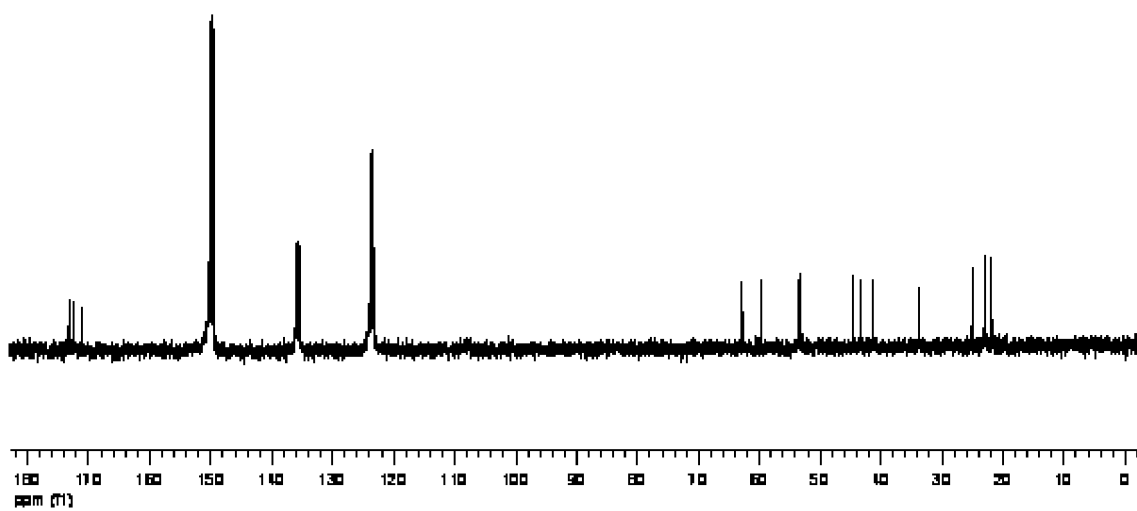
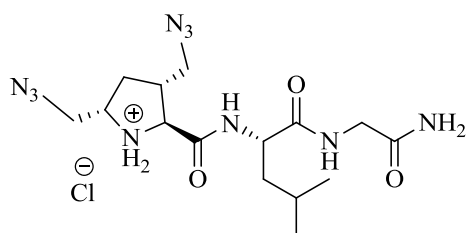
IR ν (cm⁻¹): 3271, 2927, 2104, 1656, 1655, 1543, 1261.

¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 9,86 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 9,58 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 8,41 y 8,19 (2 s an, 2H, intercambian con D₂O, ⁺NH₂), 7,10 (s an, 2H, intercambian con D₂O, NH₂), 5,05-4,99 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4,65 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, 2-H_{Pro}), 4,46 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H, 2-H_{Gly}), 4,09-3,96 (m, 3H), 3,85-3,71 (m, 2H), 3,0-2,96 (m, 1H), 2,34-2,27 (m, 1H), 1,97-1,72 (m, 2H), 1,84-1,72 (m, 2H), 0,77 (dd, *J* = 10,1, 7,0 Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu}).

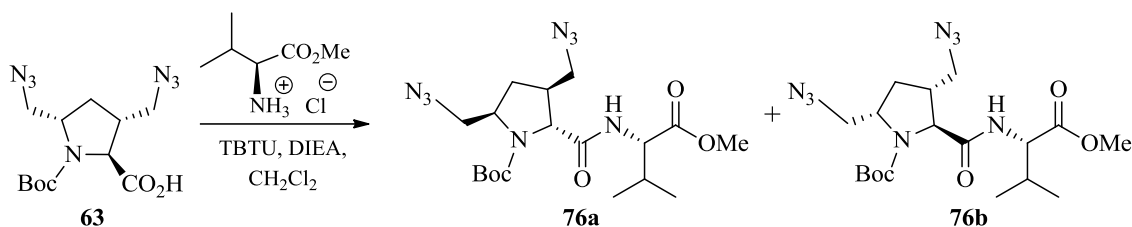
¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 173,27 (C), 172,37 (C), 172,24 (C), 62,88 (CH), 59,67 (CH), 53,54 (CH₂), 53,19 (CH), 53,05 (CH₂), 44,51 (CH), 43,38 (CH₂), 41,34 (CH₂), 33,73 (CH₂), 25,06 (CH), 23,07 y 21,82 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₁₅H₂₇N₁₀O₃: 395,2263. Encontrado: 395,2262.





3.55. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valinato de metilo (76a**) y L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valinato de metilo (**76b**)**



Seguindo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **66** (véase apartado 3.41) a partir de **63** (0,72 g, 2,21 mmol), tras la elaboración habitual y fraccionamiento del aceite amarillo (1,08 g) obtenido, mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente hexano/AcOEt (7:1), se aisló en las primeras fracciones que contenían producto el diastereoisómero **76a** (0,40 g, 41%), en un segundo grupo de fracciones se aisló mezcla de diastereoisómeros **76a** + **76b** (0,15 g, 15%) y finalmente de un tercer grupo de fracciones se aisló el diastereoisómero **76b** (0,37 g, 36%).

Compuesto **76a**: sólido blanco, p.f. = 87–89 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -15,5$ (*c* 1,05, MeOH).

IR ν (cm^{-1}): 3265, 2971, 2097, 1744, 1704, 1655, 1547, 1383, 1258, 1197, 1140, 996, 787.

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 6,61 y 6,36 (2 s an, 1H, NH), 4,59-4,51 (m, 1H), 4,19-4,06 (m, 1H), 4,05-3,90 (m, 2H), 3,73 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,58-3,40 (m, 3H), 2,40-2,21 (m, 2H), 2,15 (ddd, $J = 13,8, 7,0, 5,0$ Hz, 1H), 1,70-1,54 (m, 1H), 1,39 (s, 9H, 3 CH_3), 0,95-0,90 (m, 6H, 2 $\text{CH}_{3\text{Val}}$).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 172,12 (C), 171,72 (C), 154,13 (C), 81,14 (C), 65,54 (CH), 57,88 (CH), 56,95 (CH), 54,24 (CH_2), 52,54 (CH_2), 52,17 (CH_3), 42,51 (CH), 31,63 (CH), 30,87 (CH_2), 28,15 (3 CH_3), 18,94 y 17,76 (2 CH_3).

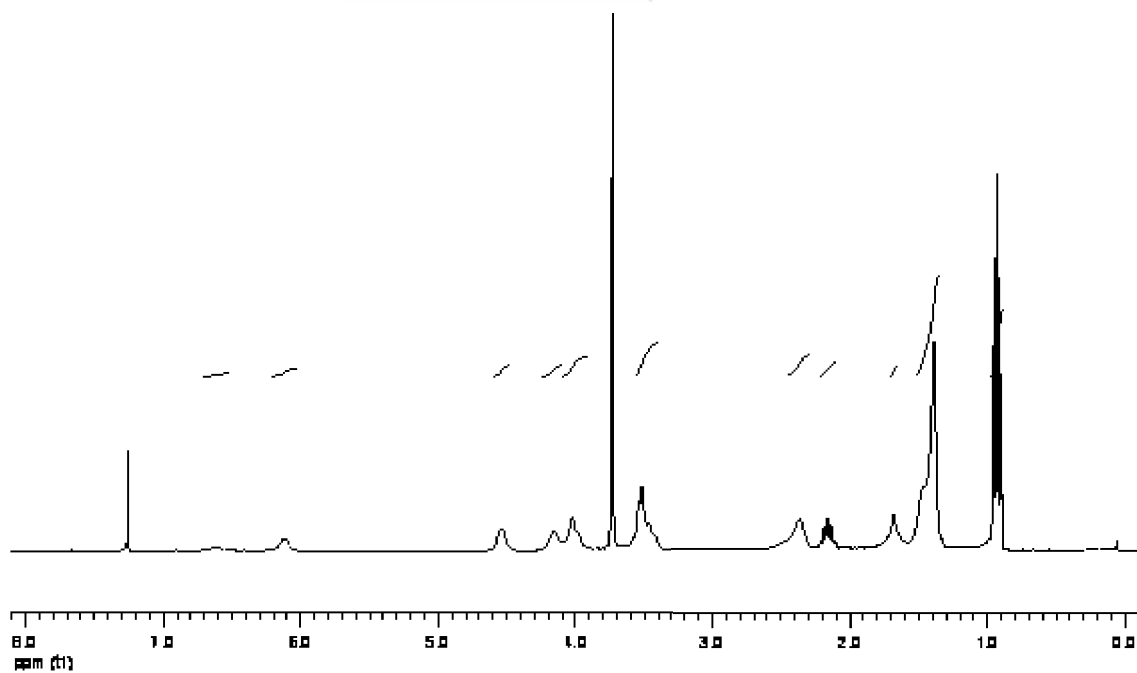
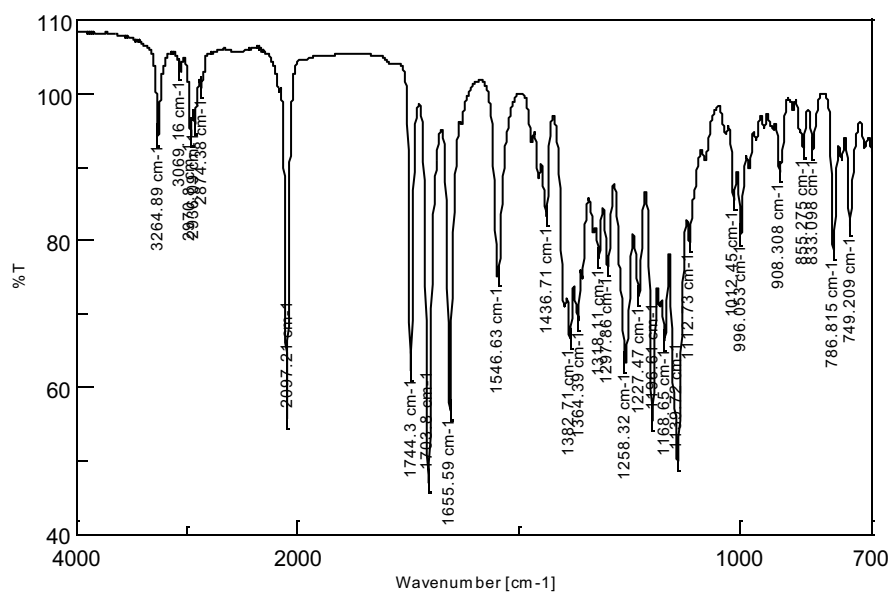
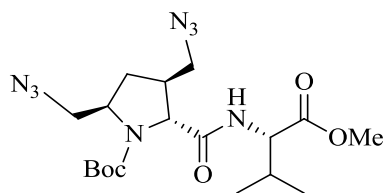
EM-IE-TDV m/z (%): 461,2 [$(\text{M} + \text{Na})^+$, 100].

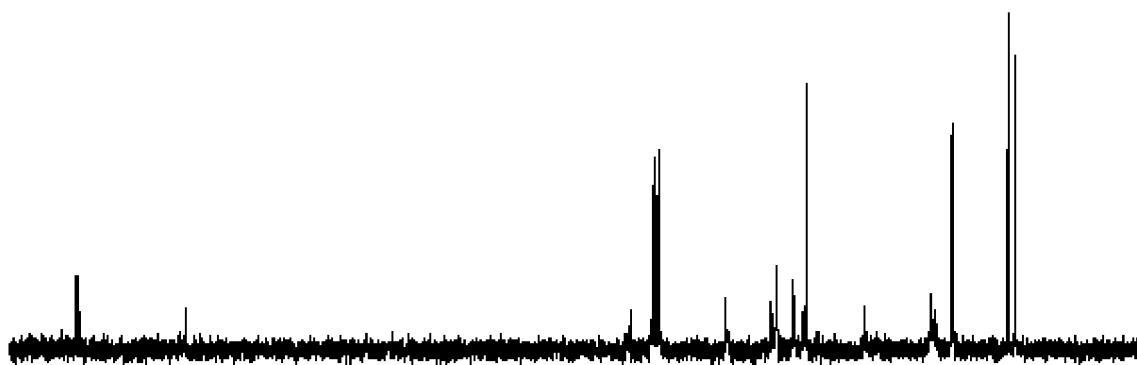
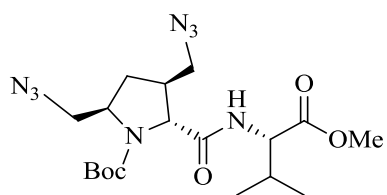
Microanálisis. Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_5$ (438,48): C 49,30; H, 6,90; N, 25,55. Encontrado: C 49,62, H 7,18, N, 25,79.

Un monocristal adecuado para análisis por difracción de rayos X, se consiguió mediante recristalización del compuesto **76a** en una mezcla de Et_2O /isooctano (1:3), tras permanecer algunos días en un lugar fresco, oscuro y sin vibraciones.

<i>Tabla 7. Datos del cristal y refinamiento de la estructura de 76a</i> ³²⁶	
Fórmula empírica	C ₁₈ H ₃₀ N ₈ O ₅
Peso fórmula	438,5
Temperatura	100,0 K
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celdilla unidad	a = 9,5219 (11) Å b = 12,5035 (16) Å c = 19,300 (3) Å
Volumen	V = 2297,7 (5) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1,268 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0,10 mm ⁻¹
F(000)	936
Tamaño del cristal	0,44 × 0,34 × 0,09 mm ³
Intervalo de theta para la recogida de datos	1,9 a 25,7°
Intervalos de índices	<i>h</i> = -11 → 11, <i>k</i> = 0 → 15, <i>l</i> = 0 → 23
Reflexiones recogidas	20673
Reflexiones independientes	4367 [R(int) = 0,041]
Compleitud para theta = 25,68°	99,9 %
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz entera en F ²
Datos / restricciones / parámetros	4367 / 10 / 290
Bondad del ajuste en F²	1,04
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0319, wR2 = 0,0706
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0409, wR2 = 0,0746
Máxima diferencia de pico y agujero	0,14 y -0,15 e.Å ⁻³

³²⁶ Los datos cristalográficos del compuesto **76a** han sido depositados en el Centro de Datos Criatolográficos de Cambridge como publicación privada CCDC 924408. Copias de estos datos pueden obtenerse libres de cargo en la aplicación del CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.





Compuesto **76b**: sólido blanco, p.f. = 50–52 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +4,0$ (c 1,0, MeOH).

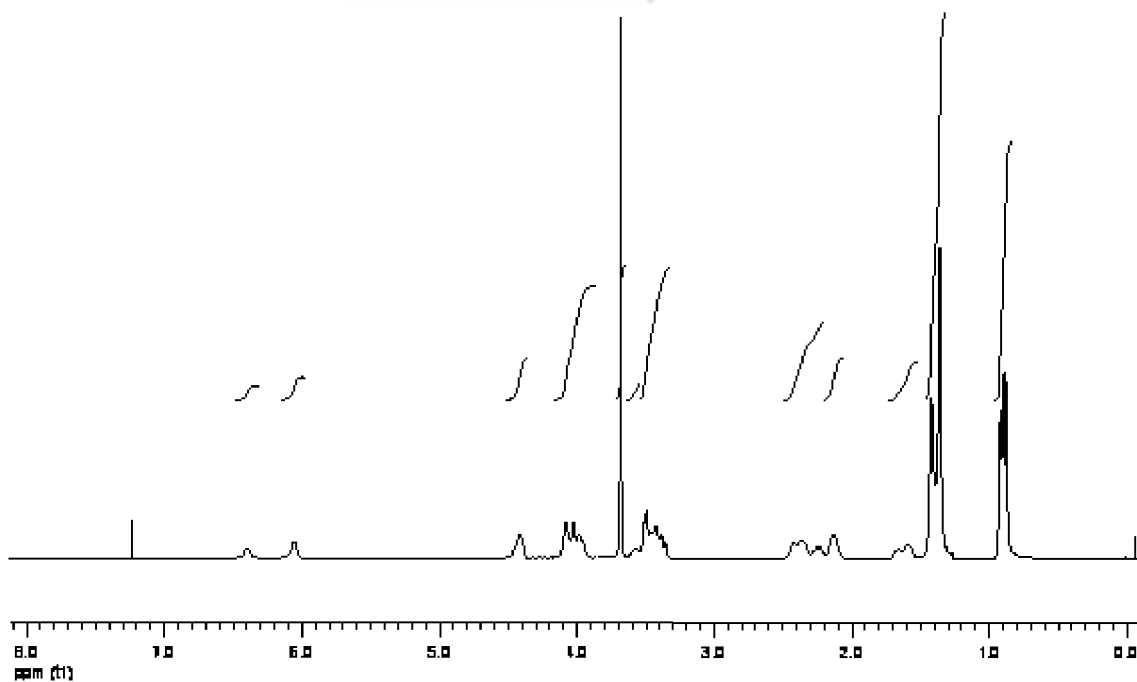
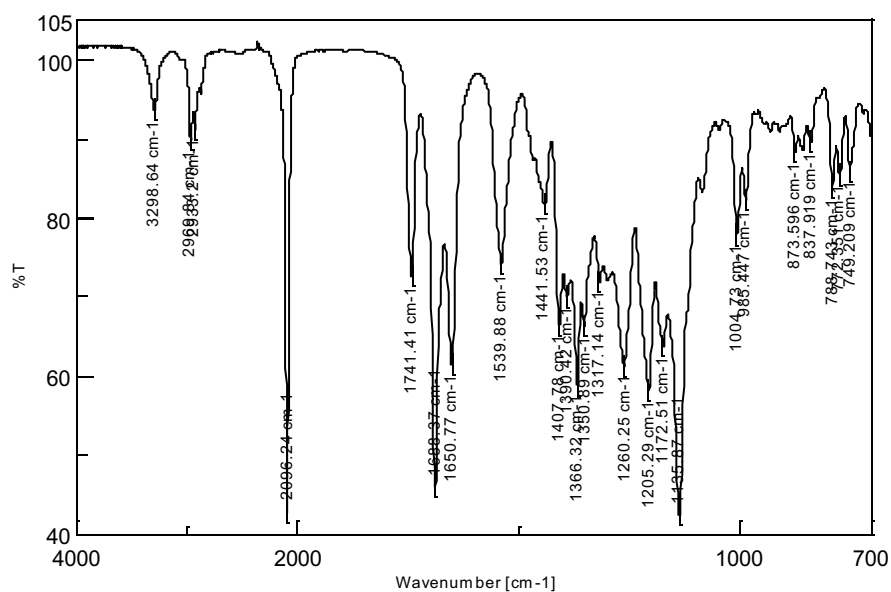
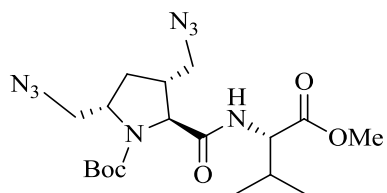
IR v (cm⁻¹): 3299, 2961, 2096, 1741, 1688, 1651, 1540, 1408, 1366, 1260, 1205, 1137, 1136, 1005, 789.

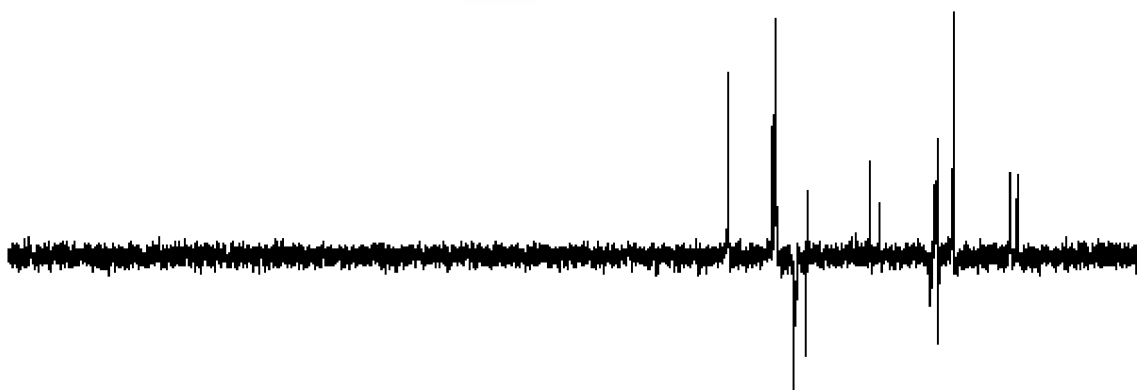
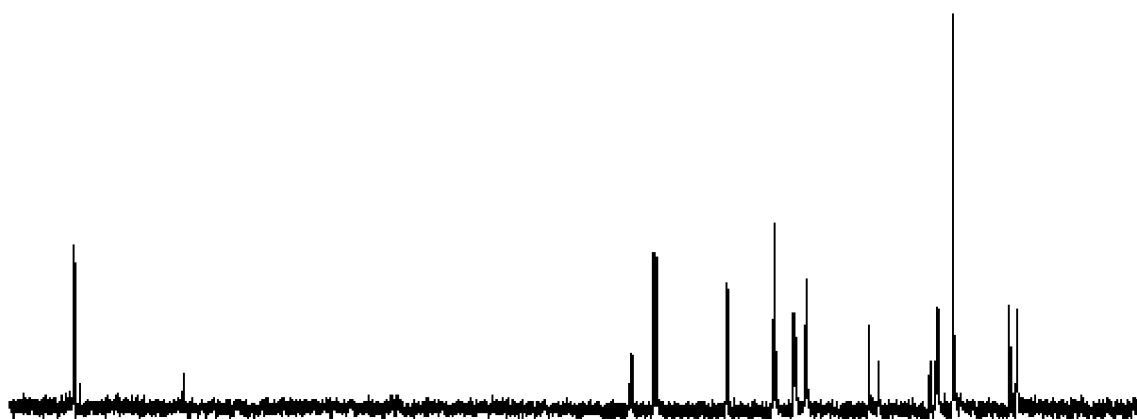
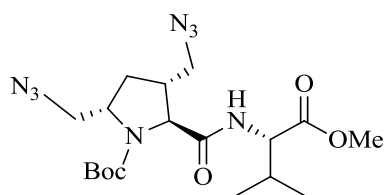
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 6,40 y 6,07 (s an y d, $J = 6,8$ Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,44-4,41 (m, 1H, 2-H), 4,10-3,98 y 3,59-3,50 (2 m, 3H), 3,70 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,49-3,38 (m, 3H), 2,45-2,22 (m, 2H), 2,16-2,15 (m, 1H), 1,70-1,57 (m, 1H), 1,42 y 1,36 (2 s, 9H, 3 CH₃), 0,92 y 0,88 (2 d, $J = 6,3$ Hz y $J = 7,3$ Hz, 6H, 2 CH_{3val}).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 172,12 (C), 171,88 y 171,24 (C), 154,16 (C), 81,33 y 80,89 (C), 65,14 (CH), 57,79 y 57,38 (CH), 54,30 y 53,92 (CH₂), 52,46 (CH₂), 52,13 (CH₃), 41,95 (CH), 40,32 (CH), 31,96 y 30,68 (CH₂), 31,24 y 30,87 (CH), 28,15 (3 CH₃), 19,02 y 17,81 (2 CH₃).

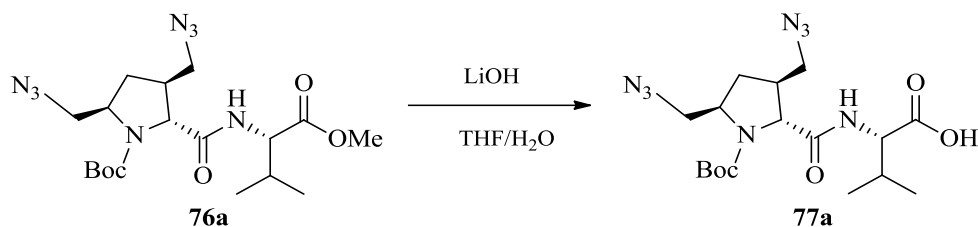
EM-IQ m/z (%): 439 [(M + 1)⁺, 1], 383 [(M⁺ - CO₂Me), 4], 382 (1), 340 (23), 339 [M⁺ - (CO₂Me + N₃), 100], 296 (13), 283 (15), 282 (53), 268 (15), 180 (641), 130 (11), 109 (12), 80 (10), 68 (21), 57 (60), 56 (15).

Microanálisis. Calculado para C₁₈H₃₀N₈O₅ (438,48): C 49,30; H, 6,90; N, 25,55. Encontrado: C 49,73, H 7,03, N, 25,74.





3.56. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valina (77a**)**



Se aplicó el procedimiento descrito para la preparación de **63** (véase apartado 3.34), sobre **76a** (0,50 g, 1,14 mmol). Trás 5 h de reacción y la elaboración habitual, se aisló **77a** como un sólido blanco (0,48 g, 99%), p.f. = 188–189 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -7,20$ (*c* 1,0, MeOH).

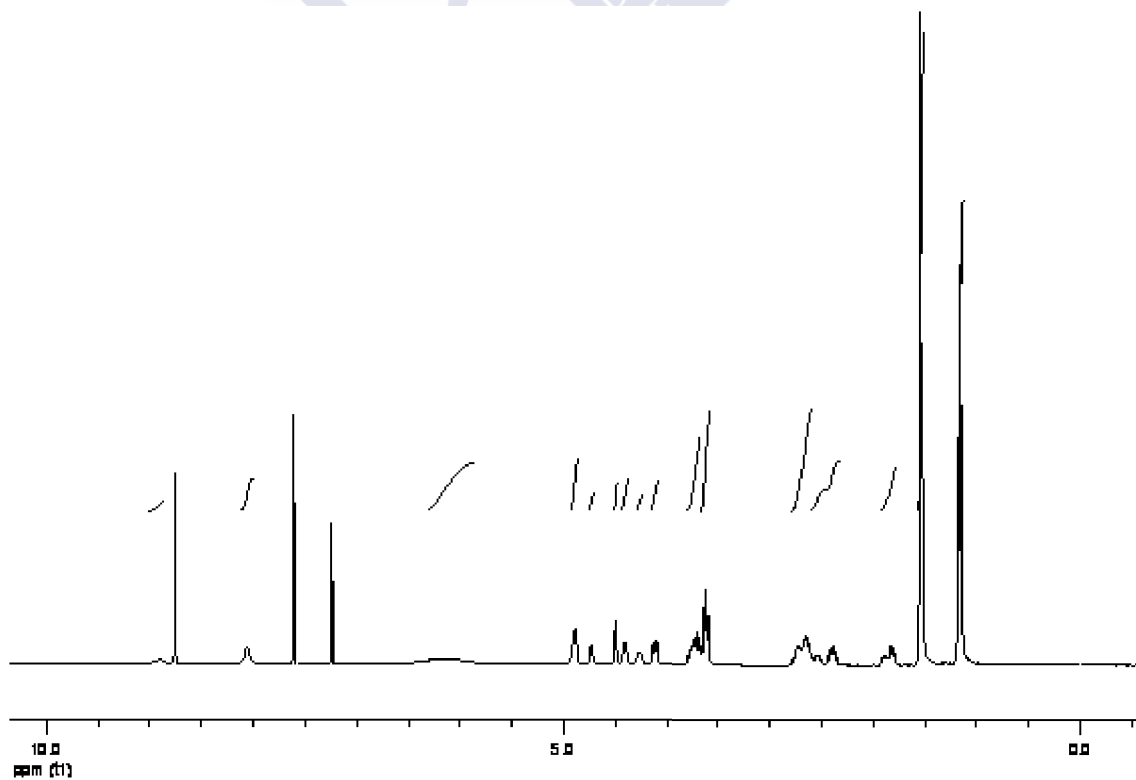
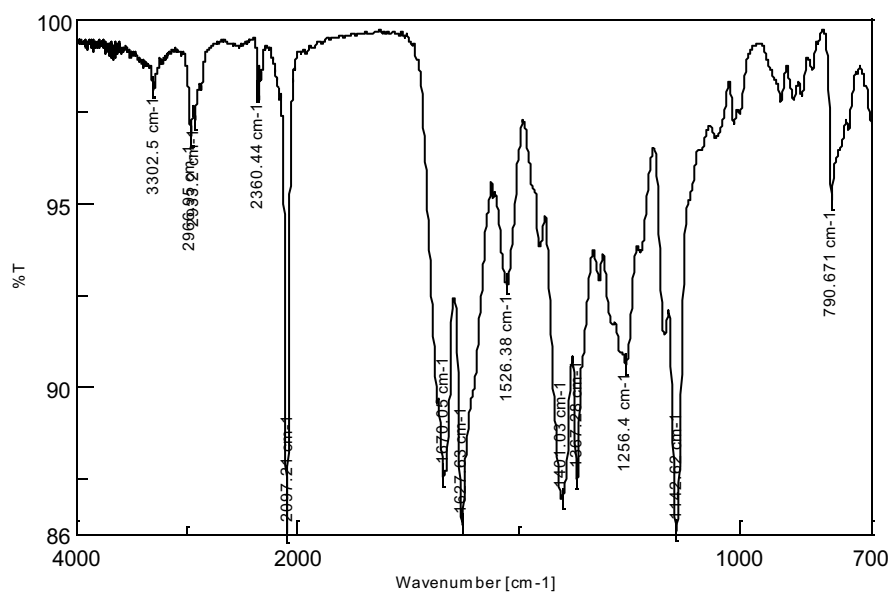
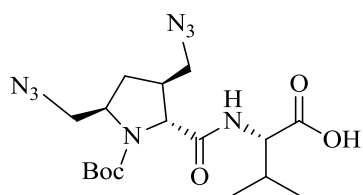
IR v (cm⁻¹): 3302, 2967, 2097, 1670, 1627, 1526, 1401, 1367, 1256, 1142.

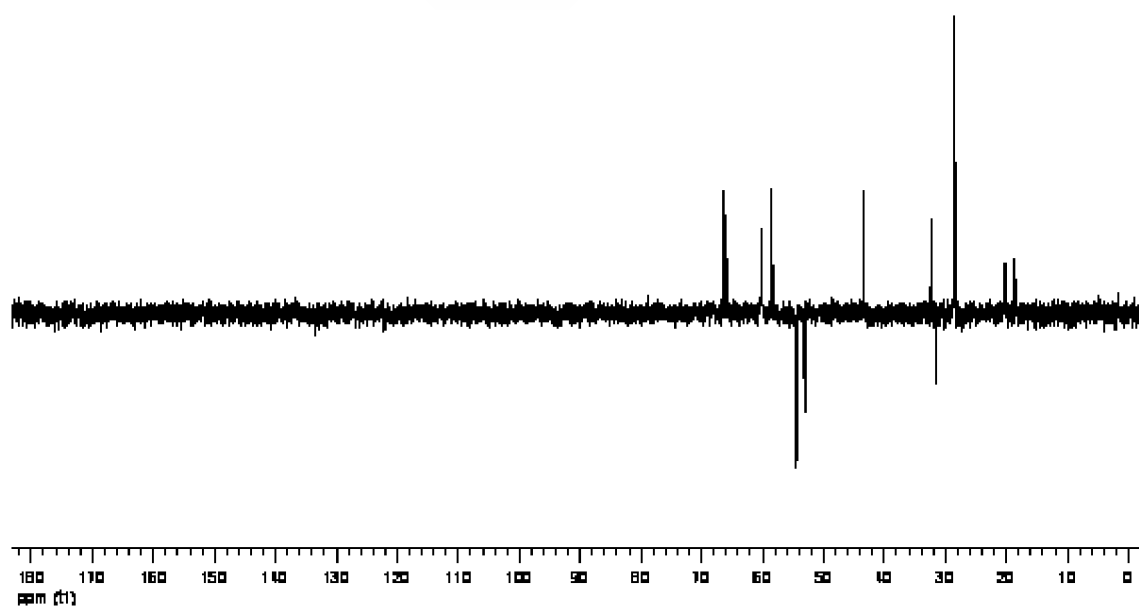
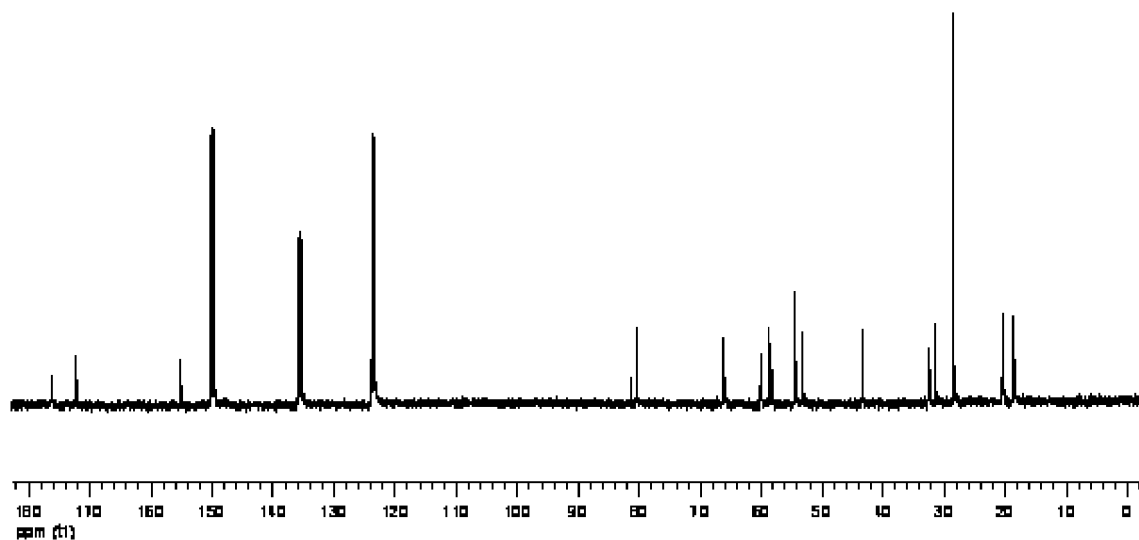
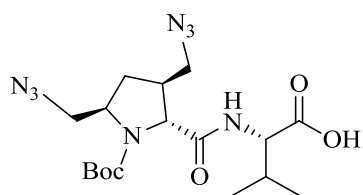
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 8,90 y 8,05 (2 s an, 1H, intercambian con D₂O, CO₂H), 6,15 (s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,91-4,89 (m, 1H), 4,74-4,70, 4,51-4,48, 4,44-4,40 y 4,38-4,25 (4 m, 2H), [4,12 (dd, *J* = 12,2, 5,8 Hz) y 3,80-3,67 (m), 2H], 3,64-3,59 (m, 2H), 2,79-2,60 (m, 2H), 2,58-2,50 y 2,43-2,36 (2 m, 1H), 1,91-1,78 (m, 1H), 1,55 y 1,53 (2 s, 9H, 3 CH₃), 1,17 (t aparente, *J* = 6,8 Hz, 6H, 2 CH₃_{Val}).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 176,32 (C), 172,24 (C), 155,12 (C), 81,39 y 80,46 (C), 66,26 y 65,93 (CH), 60,11 (CH), 58,60 y 58,20 (CH), 54,42 y 54,24 (CH₂), 53,07 (CH₂), 43,37 (CH), 32,52 y 32,34 (CH), 31,44 (CH₂), 28,49 (3 CH₃), 20,47, 20,24, 18,64 y 18,37 (2 CH₃).

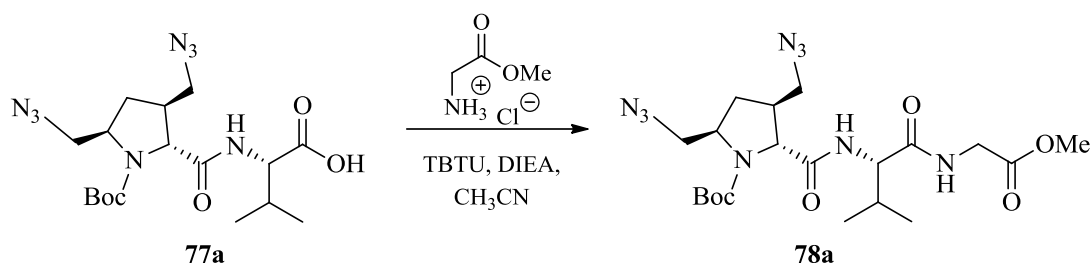
EM-IE-TDV *m/z* (%): 447,2 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₁₇H₂₈N₈O₅ (424,45): C 48,10, H 6,65, N 26,40. Encontrado: C 48,47, H 6,88, N, 26,64.





3.57. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicinato de metilo (78a**)**



Aplicando el procedimiento descrito para la síntesis de **66** (véase apartado 3.41) se preparó **78a** a partir de **77a** (0,20 g, 0,47 mmol) y clorhidrato de glicinato de metilo (0,07 g, 0,57 mmol), empleando CH₃CN (12 mL) como disolvente, tras 17 h de reacción. Realizada la elaboración habitual se obtuvo un sólido beige (0,22 g) que fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt (1:3), aislándose por eliminación del disolvente a sequedad, de las fracciones que contenían producto, **78a** (0,18 g, 77%) como un sólido blanco, p.f. = 164–166 °C.

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -40,50$ (c 1,05, MeOH).

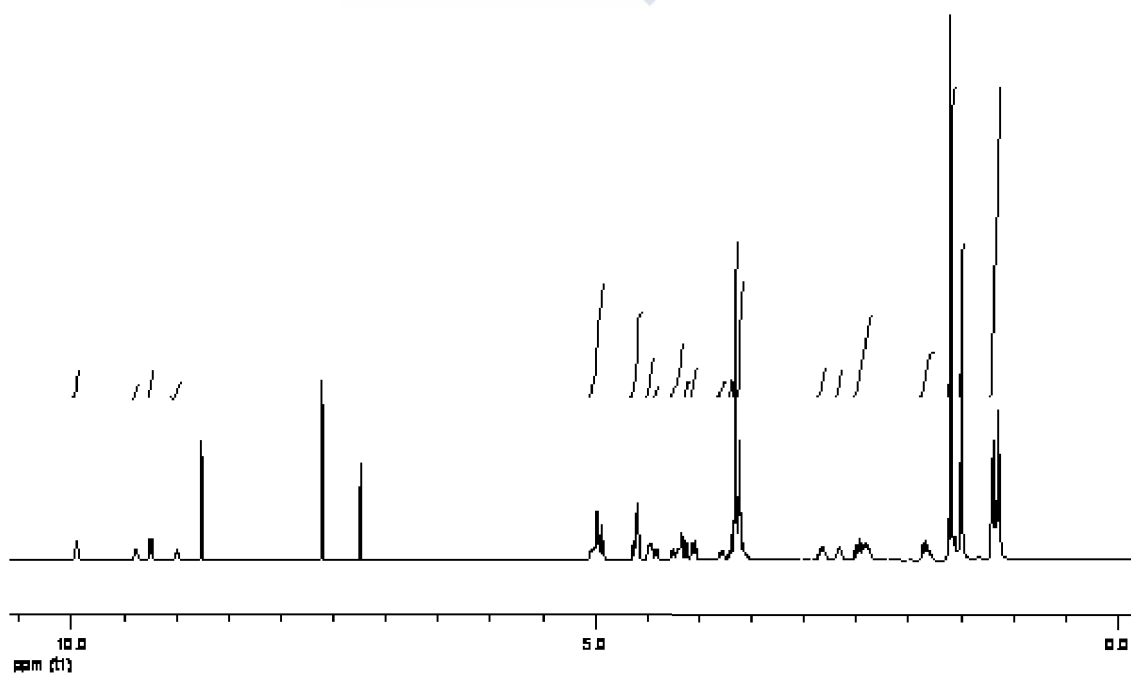
IR v (cm⁻¹) (se observa la presencia de rotámeros): 3332, 3225, 2958, 2936, 2106, 2092, 1764, 1752, 1693, 1681, 1640, 1557, 1438, 1391, 1363, 1204, 1178, 774.

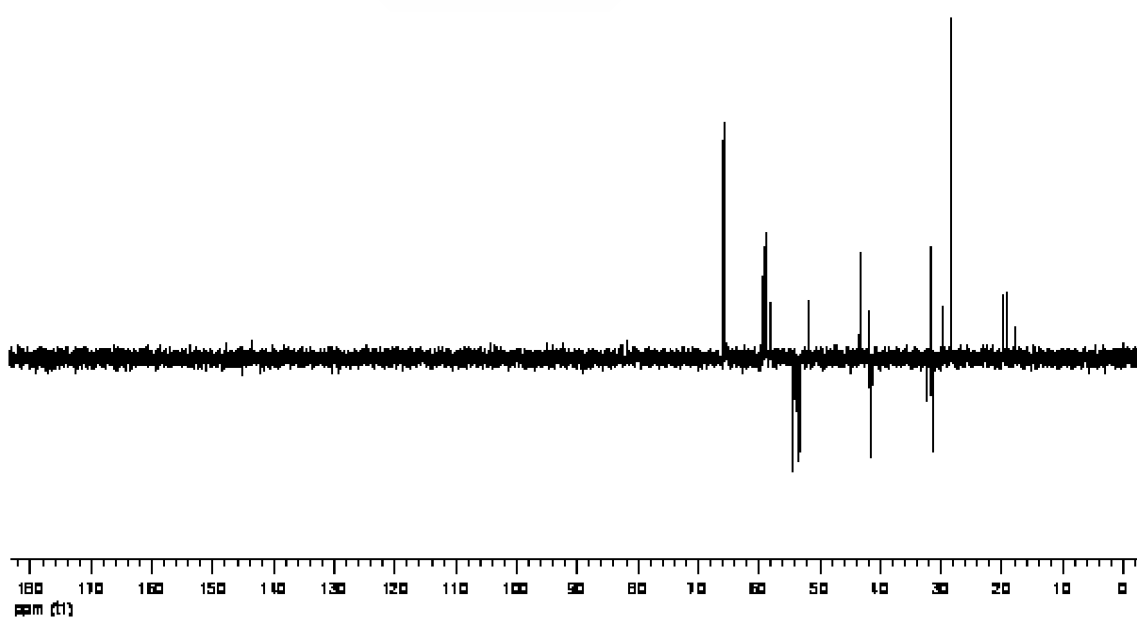
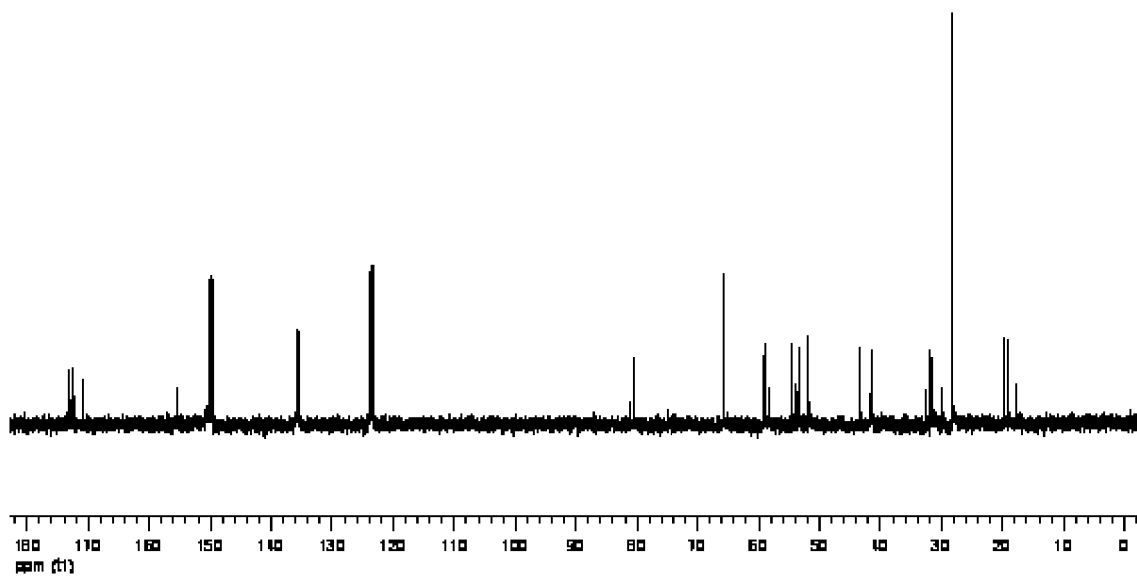
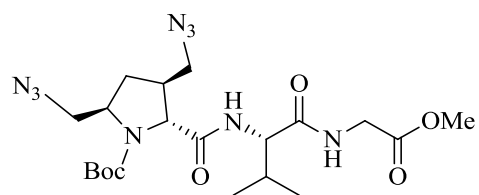
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 9,95 y 8,99 (2 s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), [9,38 (d, J = 8,8 Hz) y 9,23 (d, J = 8,4 Hz), 1H, intercambia con D₂O, NH], 5,05-4,92 (m, 2H), 4,64-4,58, 4,51-4,45, 4,42-4,40, 4,26-4,16 y 4,13-4,12 (5 m, 4H), [4,05 (dd, J = 12,2, 6,4 Hz) y 3,79 (dd, J = 12,2, 5,4 Hz), 1H], 3,72-3,67, 3,62-3,57 y 2,86-2,79 (3 m, 3H), 3,65 y 3,62 (2 s, 3H, CO₂CH₃), 2,70-2,64 y 2,52-2,35 (2 m, 2H), 1,89-1,77 (m, 1H), 1,60 y 1,49 (2 s, 9H, 3 CH₃), [1,20 (d, J = 6,9 Hz), 1,16 (d, J = 2,4 Hz) y 1,13 (d, J = 6,8 Hz), 6H, 2 CH₃_{val}].

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 173,08 y 172,85 (C), 172,63 y 172,37 (C), 170,93 (C), 155,44 (C), 81,33 y 80,53 (C), 65,84 (CH), 59,23 y 59,09 (CH), 58,80 y 58,21 (CH), 54,51 y 53,96 (CH₂), 53,54 y 53,31 (CH₂), 51,87 y 51,80 (CH₃), 43,38 y 41,90 (CH), 41,74 y 41,44 (CH₂), 32,46 y 31,51 (CH₂), 31,76 y 29,82 (CH), 28,34 (3 CH₃), 19,86, 19,74, 19,15 y 17,82 (2 CH₃).

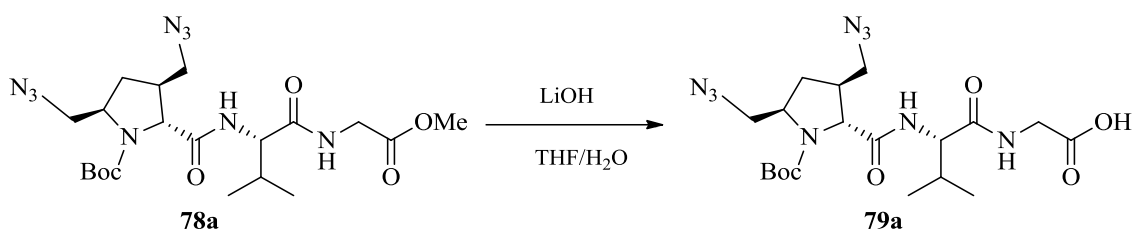
EM-IE-TDV m/z (%): 518,2 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₂₀H₃₃N₉O₆ (495,53): C 48,48, H 6,71, N 25,44. Encontrado: C 48,36, H 7,01, N, 25,72.





3.58. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicina (79a**)**



Se aplicó el procedimiento descrito para la preparación de **63** (véase apartado 3.34), y tras 24 h de reacción y la elaboración habitual, se obtuvo a partir de **78a** (100 mg, 0,20 mmol), **79a** (90 mg, 93%), como un sólido blanco, p.f. = 136–138 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -31,25$ (*c* 0,99, MeOH).

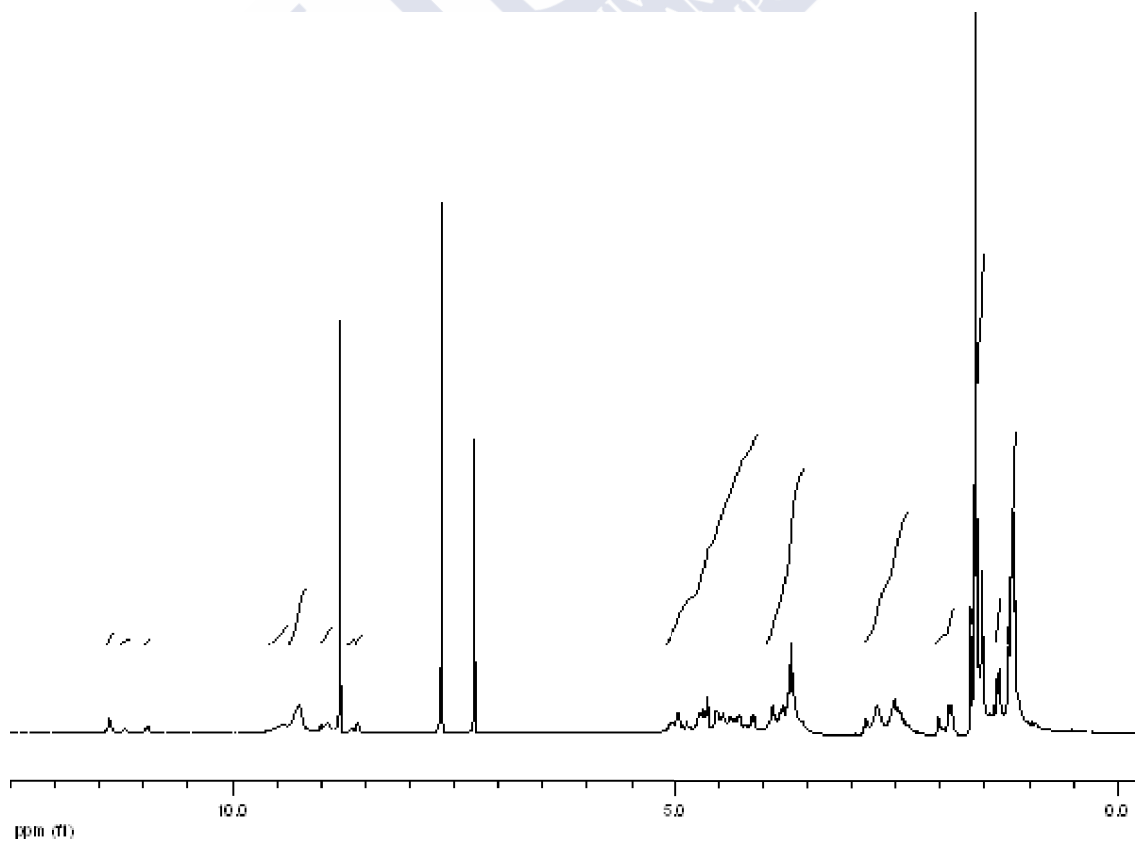
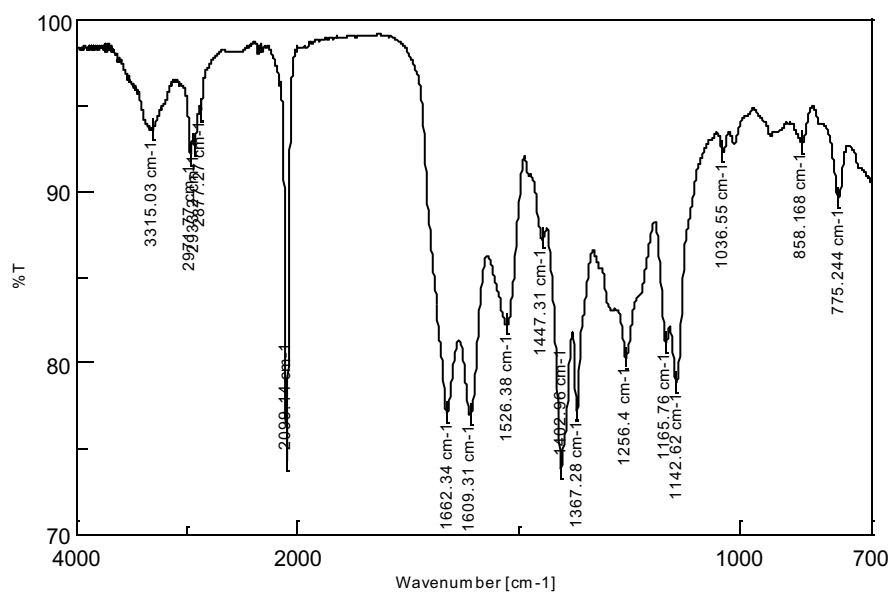
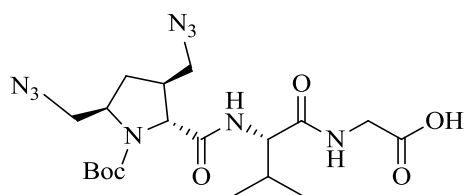
IR v (cm⁻¹): 3315, 2972, 2933, 2106, 2099, 1662, 1609, 1526, 1403, 1367, 1256, 1166, 1143, 775.

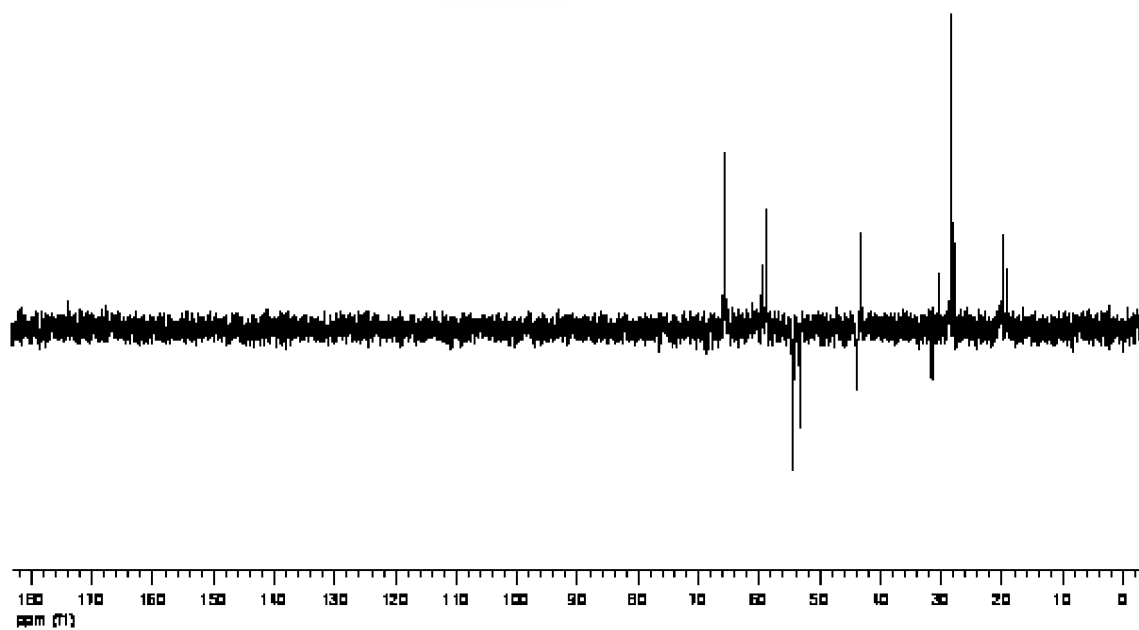
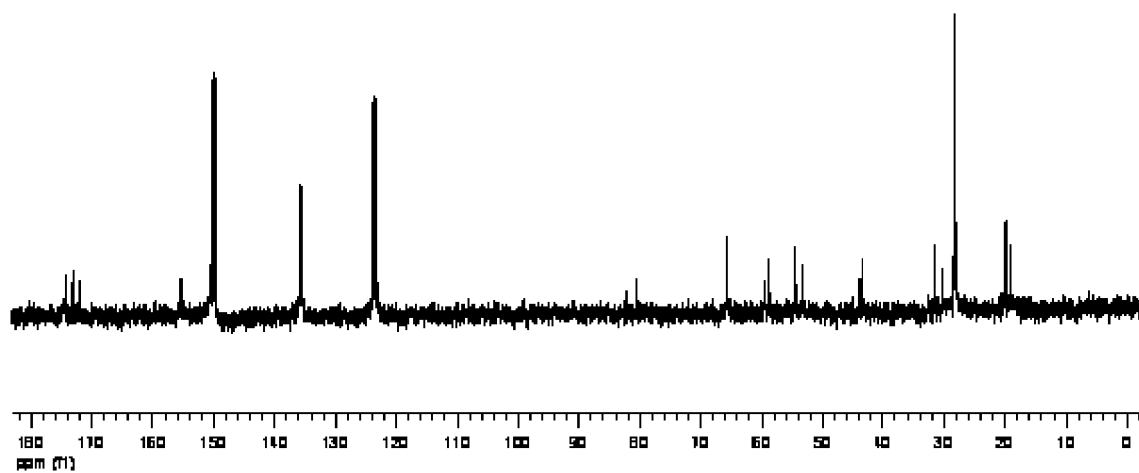
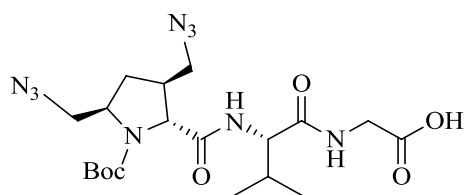
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [11,40-10,93 (3 m), 9,46-8-56 (5 m), el conjunto integra para 3H, intercambian con D₂O, CO₂H y 2 NH], 5,08-4,09 (m, 5H), 3,91-3,56 (m, 4H), 2,84-2,40 (m, 3H), 2,03-1,71 (m, 1H), 1,66-1,53 (m, 9H, 3 CH₃), 1,48-1,33 y 1,29-1,16 (2 m, 6H, 2 CH₃_{Leu}).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 174,13 (C), 173,10 (C), 171,89 (C), 155,52 y 155,37 (C), 82,30 y 80,58 (C), 65,84 (CH), 59,56 (CH), 58,79 (CH), 54,51 y 54,32 (CH₂), 53,31 (CH₂), 43,97 y 43,89 (CH₂), 43,38 (CH), 31,56 (CH₂), 30,31 (CH), 28,54, 28,35, 28,07 y 27,92 (3 CH₃), 19,89 y 19,18 (2 CH₃).

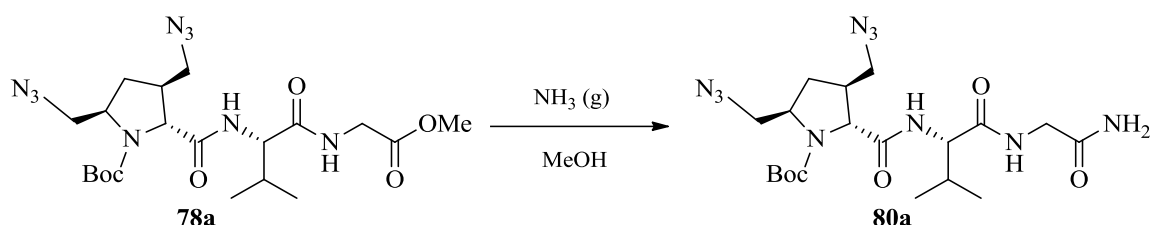
EM-IE-TDV *m/z* (%): 504,2 [(M + Na)⁺, 88], 488,2 (65), 448,2 (38), 382,2 (100).

Microanálisis. Calculado para C₁₉H₃₁N₉O₆ (481,51): C 47,39, H 6,49, N 26,18. Encontrado: C 47,63, H 6,71, N, 25,85.





3.59. D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicinamida (80a**)**



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **72a** (véase apartado 3.45), a partir de **78a** (0,15 g, 0,22 mmol) se obtuvo tras la elaboración habitual, **80a** (0,14 g, 99%) como un sólido blanco, p.f. = 186–188 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -27,10$ (c 1,0, MeOH).

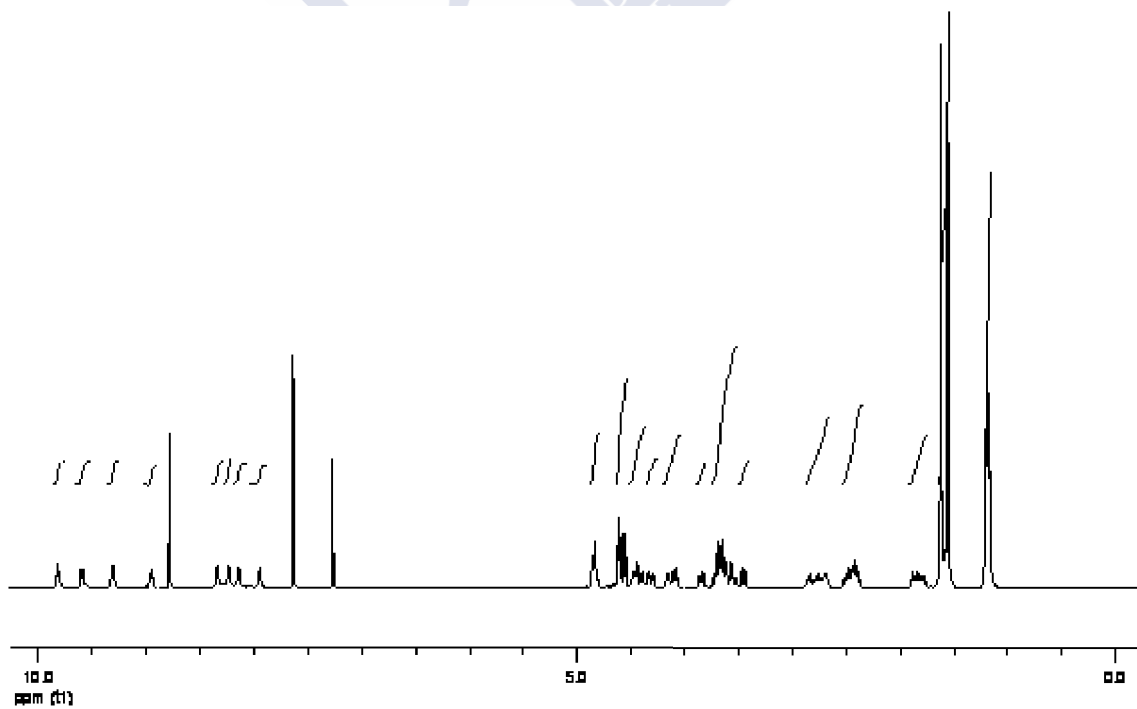
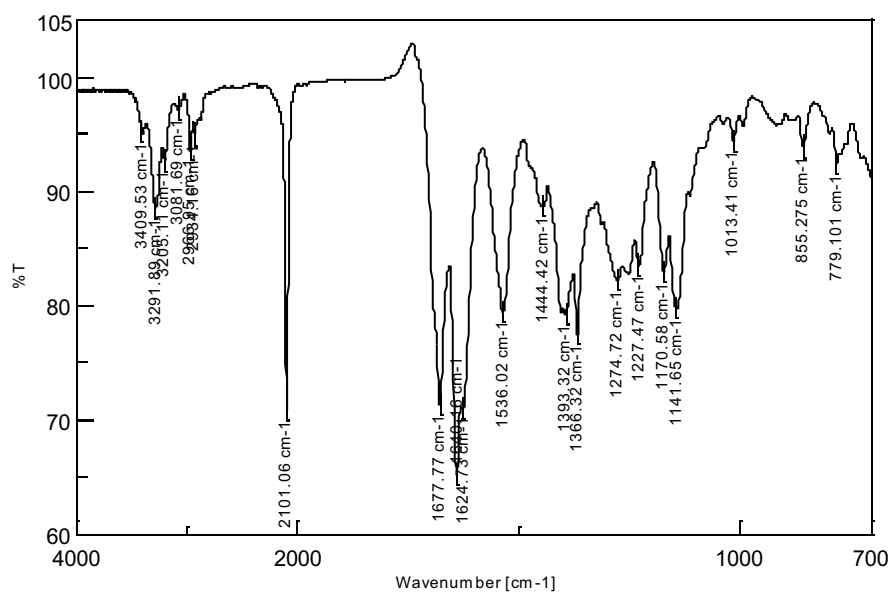
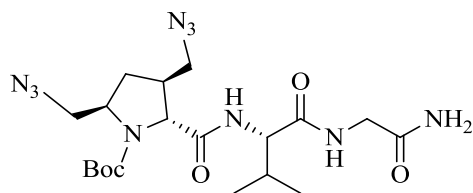
IR v (cm⁻¹): 3292, 3205, 2967, 2101, 1678, 1640, 1625, 1536, 1393, 1366, 1275, 1227, 1171, 1142.

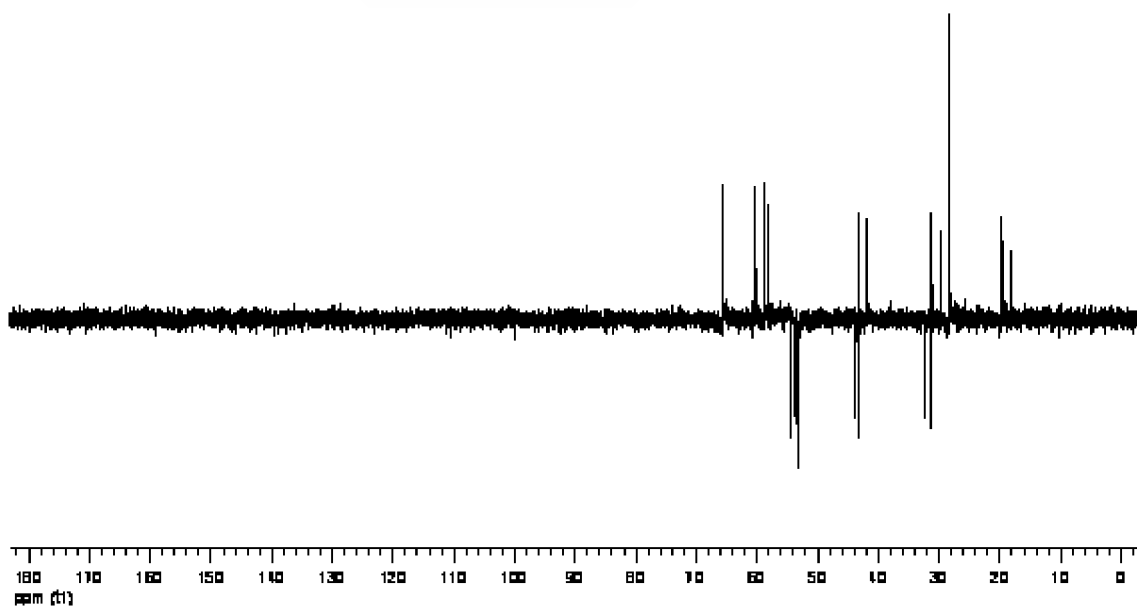
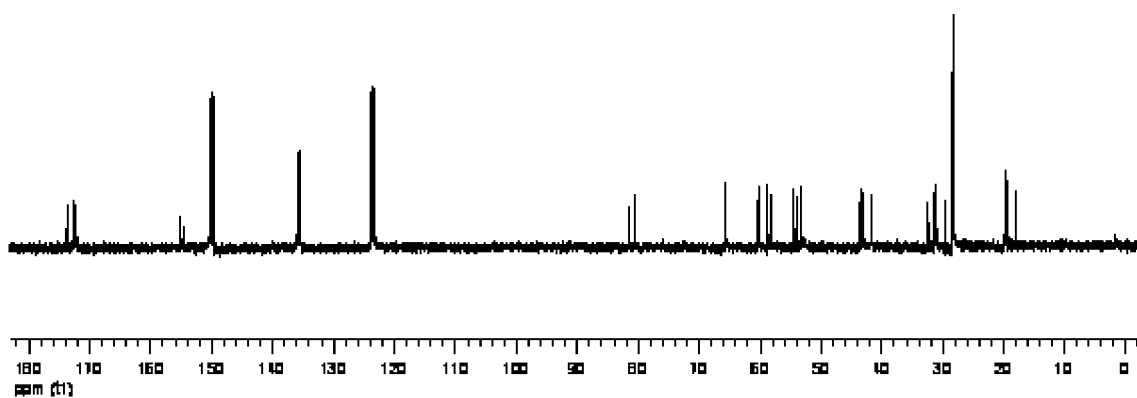
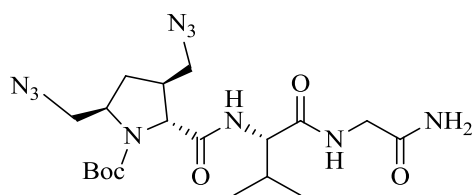
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [9,83 (t, $J = 5,3$ Hz), 9,60 (d, $J = 7,4$ Hz), 9,31 (d, $J = 7,8$ Hz) y 8,95 (t, $J = 5,8$ Hz), 2H, intercambian con D₂O, 2 NH], 8,32, 8,24, 8,14 y 7,95 (4 s an, 2H, intercambian con D₂O, NH₂), 4,86-4,81 (m, 1H), 4,63-4,55 (m, 2H), [4,49-4,46 (m) y 4,42 (dd, $J = 16,6$, 5,4 Hz), 1H], [4,32 (dd, $J = 17,1$, 5,4 Hz) y 3,84 (dd, $J = 12,2$, 5,3 Hz), 1H], [4,17-4,14 (m) y 4,09 (dd, $J = 12,2$, 5,9 Hz), 1H], [3,74-3,52 (m) y 3,45 (d, $J = 12,3$ Hz), 3H], 2,86-2,68 y 2,52-2,38, 2 m, 3H), 1,89-1,76 (m, 1H), 1,62 y 1,56 (2 s, 9H, 3 CH₃), 1,21-1,16 (m, 6H, 2 CH_{3Val}).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 173,76 y 173,49 (C), 172,54 y 172,48 (C), 172,21 y 172,16 (C), 155,31 y 154,68 (C), 81,54 y 80,64 (C), 65,74 y 65,65 (CH), 60,53 y 60,27 (CH), 58,74 y 58,12 (CH), 54,45 y 53,87 (CH₂), 53,33 y 53,27 (CH₂), 43,77 y 43,17 (CH₂), 43,35 y 41,85 (CH), 32,4 y 31,44 (CH₂), 31,23 y 29,65 (CH), 28,45 y 28,36 (3 CH₃), 19,86, 19,74, 19,38 y 18,12 (2 CH₃).

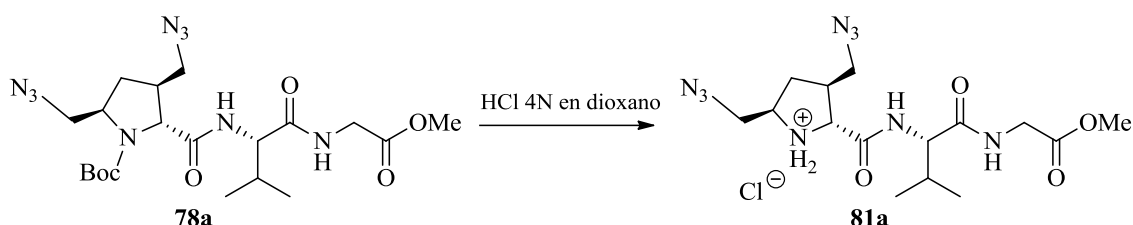
EM-IE-TDV m/z (%): 503,2 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₁₉H₃₂N₁₀O₅ (480,52): C 47,49, H 6,71, N 29,15. Encontrado: C 47,73, H 6,95, N, 29,33.





3.60. Clorhidrato de D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicinato de metilo (**81a**)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **73a** (véase apartado 3.46) hemos obtenido **81a** a partir de **78a** (60 mg, 0,12 mmol) como un sólido beige (40 mg, 76%) de bajo punto de fusión.

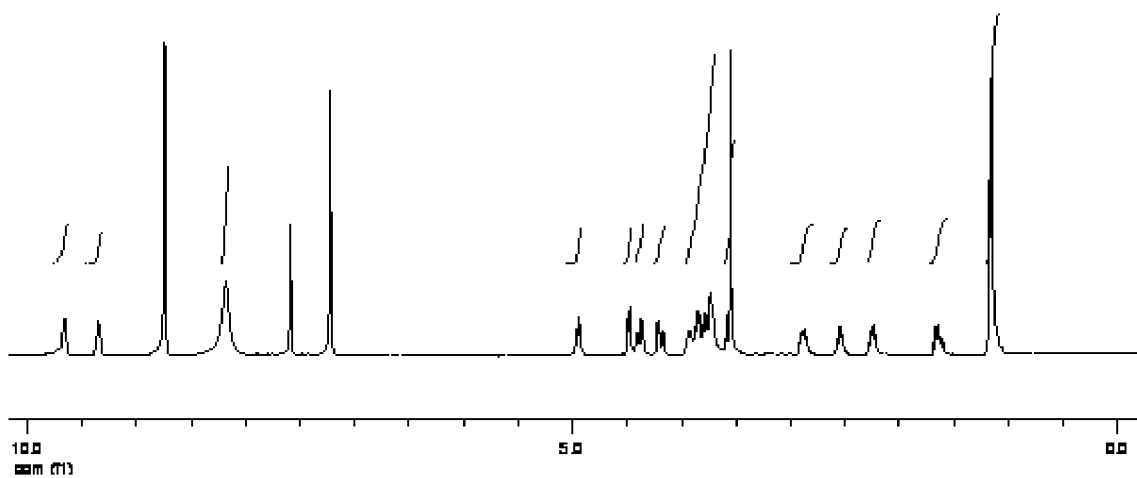
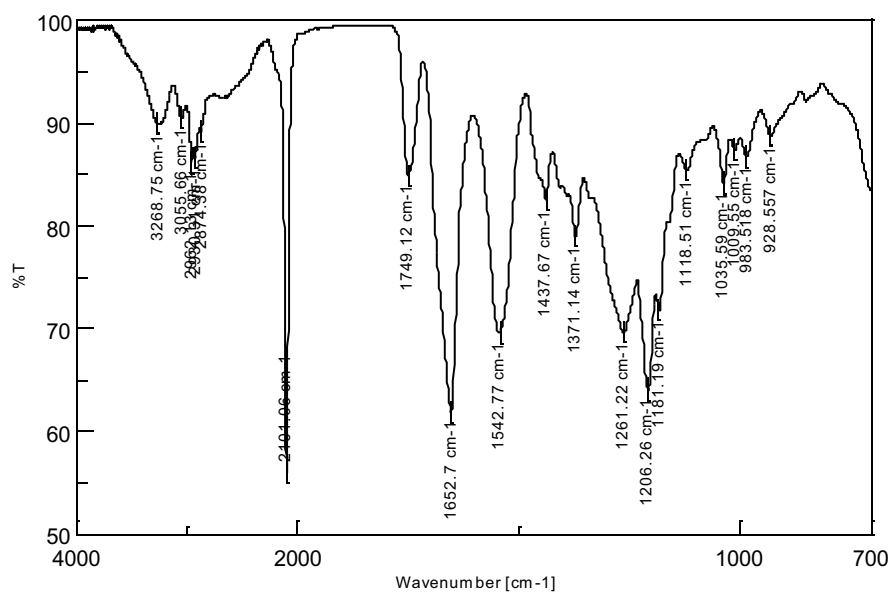
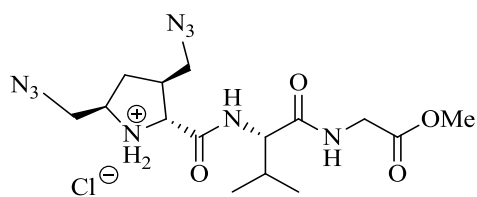
$[\alpha]_D^{25} = -33,83$ (*c* 1,15, MeOH).

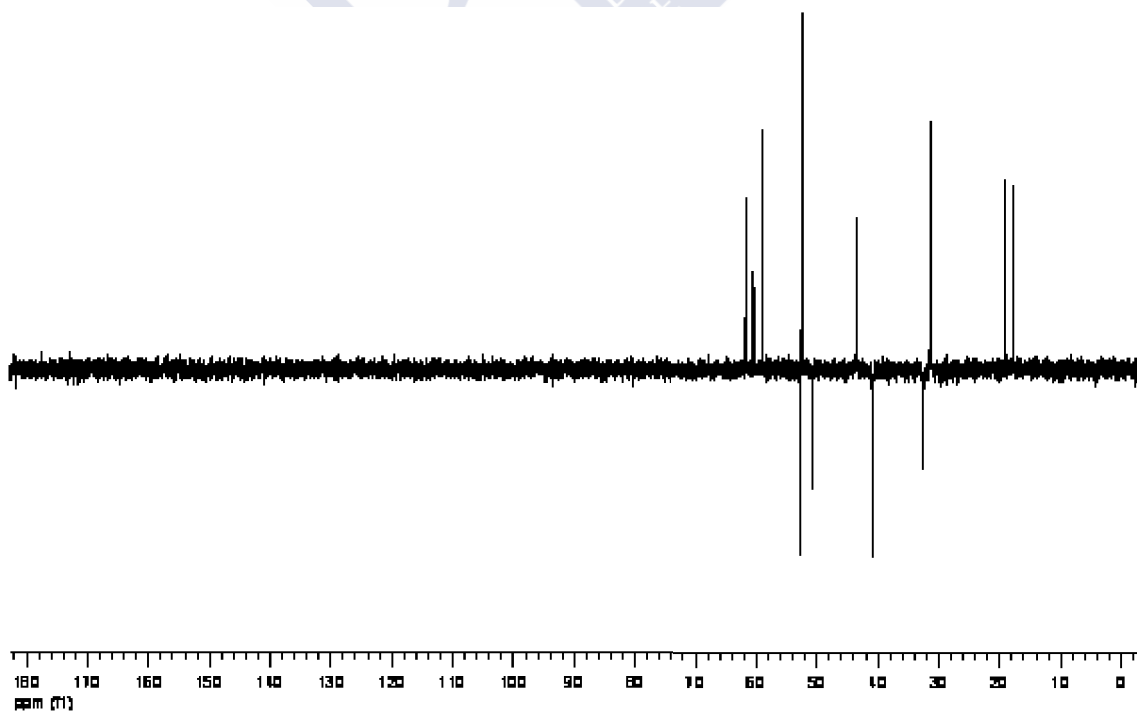
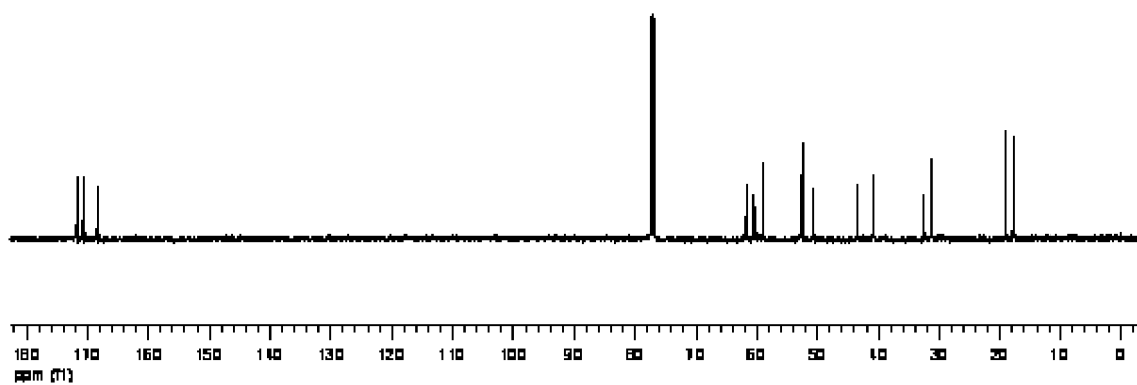
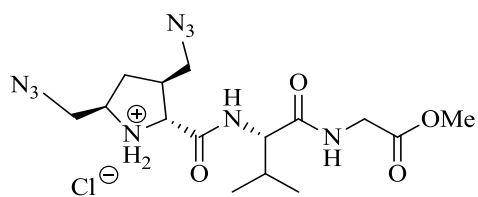
IR v (cm⁻¹): 3269, 2962, 2101, 1749, 1653, 1543, 1371, 1261, 1206, 1182.

¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 9,68 (s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 9,34 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 8,17 (s an, 2H, intercambian con D₂O, ⁺NH₂), 4,97 -4,93 (m, 1H), 4,48 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, 2-H_{Val}), 4,38 (dd, *J* = 17,3, 6,2 Hz, 1H, CHH_{Gly}), 4,18 (dd, *J* = 17,3, 5,1 Hz, 1H, CHH_{Gly}), 3,92-3,63 (m, 5H), 3,59 y 3,55 (2 s, 3H, CO₂CH₃), 2,92-2,85 (m, 1H), 2,59-2,48 (m, 1H), 2,28-2,21 (m, 1H), 1,69-1,59 (m, 1H), 1,16 (d, *J* = 6,3 Hz, 6H, 2 CH_{3Val}).

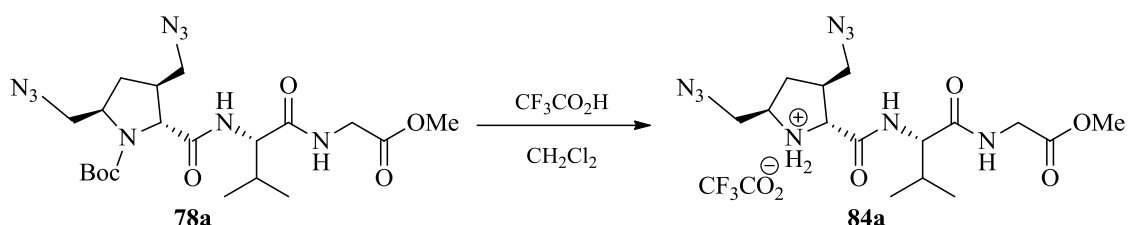
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 171,76 (C), 170,78 (C), 168,45 (C), 61,74 (CH), 60,46 (CH), 59,05 (CH), 52,79 (CH₂), 52,50 (CH₃), 50,67 (CH₂), 43,54 (CH), 40,91 (CH₂), 32,66 (CH₂), 31,38 (CH), 19,15 y 17,89 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z* (%): Calculado para C₁₅H₂₆N₉O₄: 396,2103. Encontrado: 396,2109.





3.61. Trifluoroacetato de D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidometil)prolil-L-valilglicinato de metilo (84a)



El compuesto **78a** (50 mg, 0.12 mmol) se trató en las condiciones indicadas previamente (apartado 3.32.1), tras 3 h de reacción a temperatura ambiente y elaboración habitual, el residuo gomoso obtenido (60 mg) se tomó en AcOEt/ciclohexano precipitando **84a** (26 mg, 50%) como un sólido blanco, p.f. = 112–114 °C.

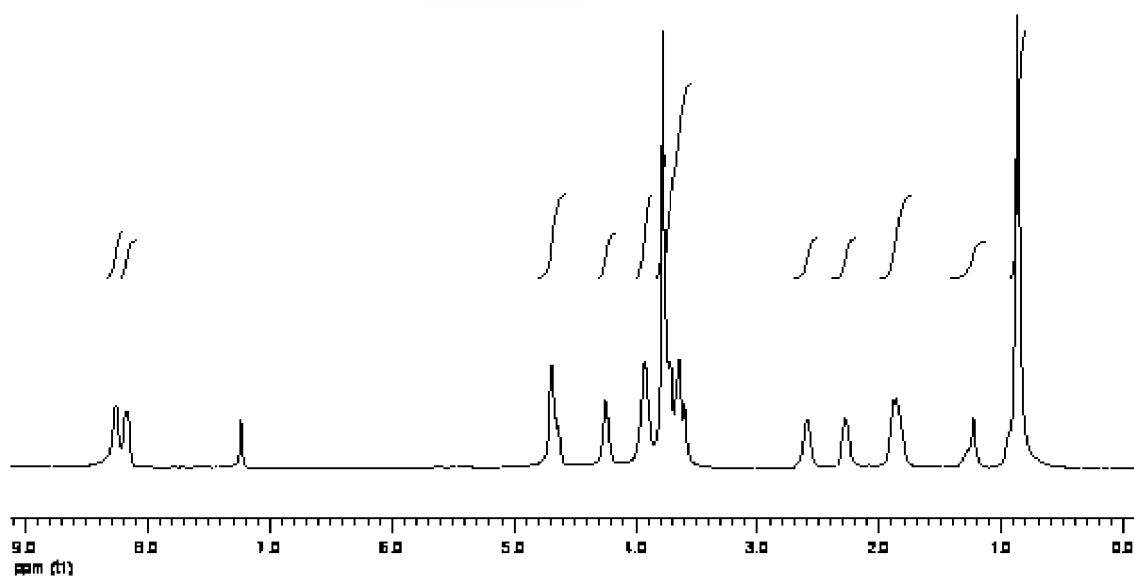
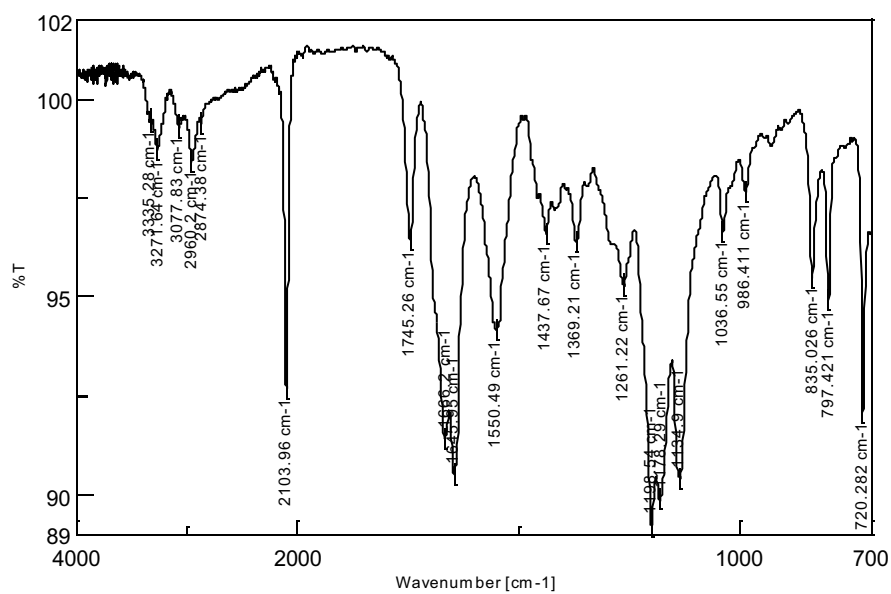
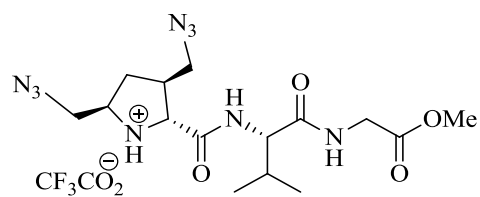
$[\alpha]_D^{25} = -25,89$ (*c* 0,90, MeOH).

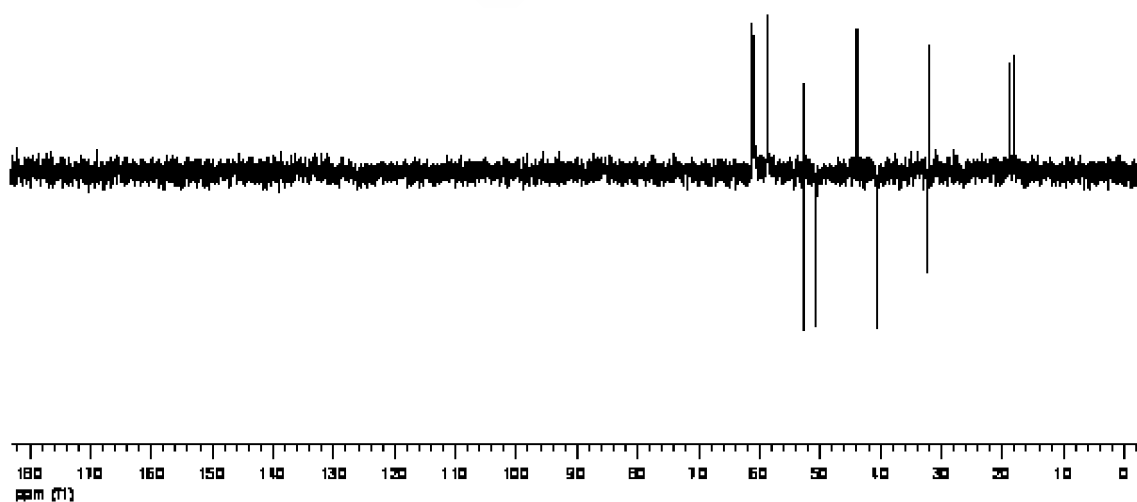
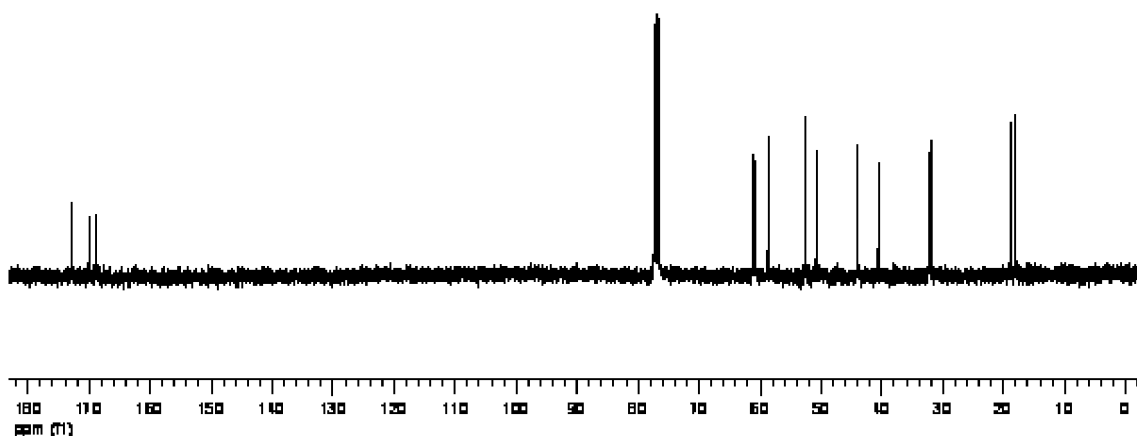
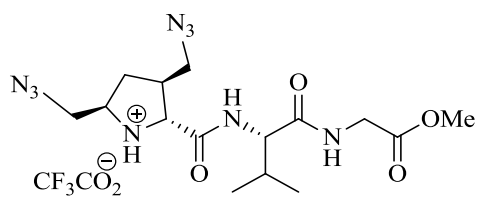
IR v (cm⁻¹): 3272, 2960, 2104, 1745, 1666, 1646, 1551, 1438, 1369, 1261, 1199, 1178, 1135, 1037, 835, 797, 720.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 8,26 (s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 8,17 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,69-4,63 (m, 2H), 4,25-4,23 (m, 1H), 3,93-3,91 (m, 2H), 3,78 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,72-3,59 (m, 5H, dos de ellos intercambian con D₂O, ⁺NH₂), 2,76-2,59 (m, 1H), 2,39-2,27 (m, 1H), 1,92-1,80 (m, 2H), 1,37-1,20 (m, 1H), 0,87 (s, 6H, 2 CH₃_{val}).

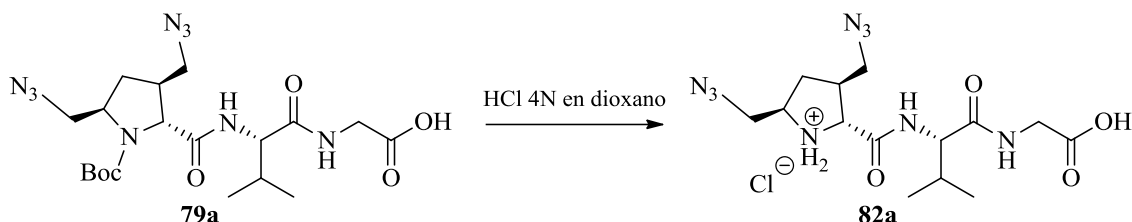
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,93 (C), 170,05 (C), 169,03 (C), 61,17 (CH), 60,88 (CH), 58,66 (CH), 52,69 (CH₂), 52,61 (CH₃), 50,75 (CH₂), 43,98 (CH), 40,58 (CH₂), 32,21 (CH₂), 32,06 (CH), 18,76 y 18,12 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₁₅H₂₆N₉O₄: 396,2103. Encontrado: 396,2153.





3.62. Clorhidrato de D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicina (**82a**)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **73a** (véase apartado 3.46) hemos obtenido **82a** a partir de **79a** (60 mg, 0,12 mmol) como un sólido beige (48 mg, 92%) de bajo punto de fusión.

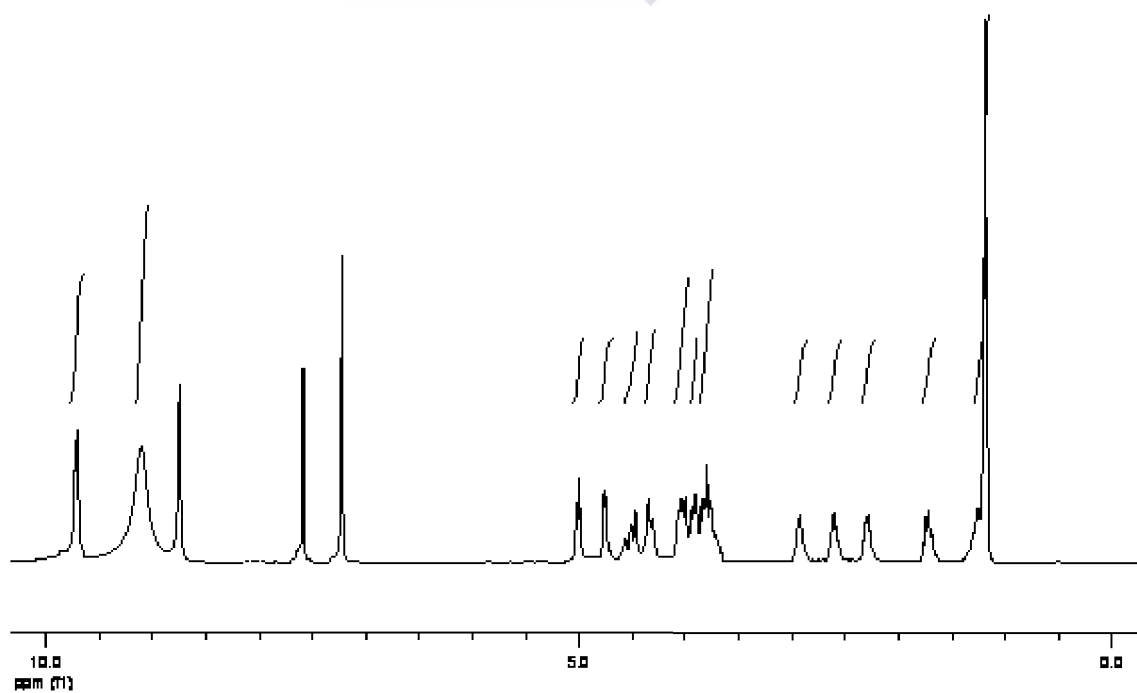
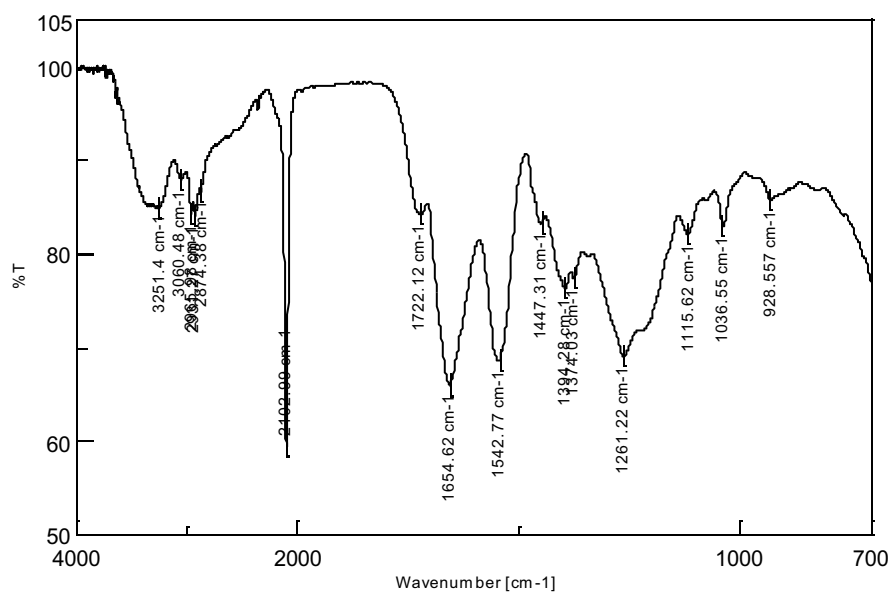
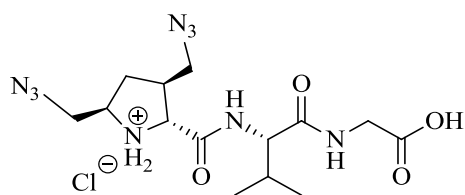
$[\alpha]_D^{25} = -24,21$ (c 0,95, MeOH).

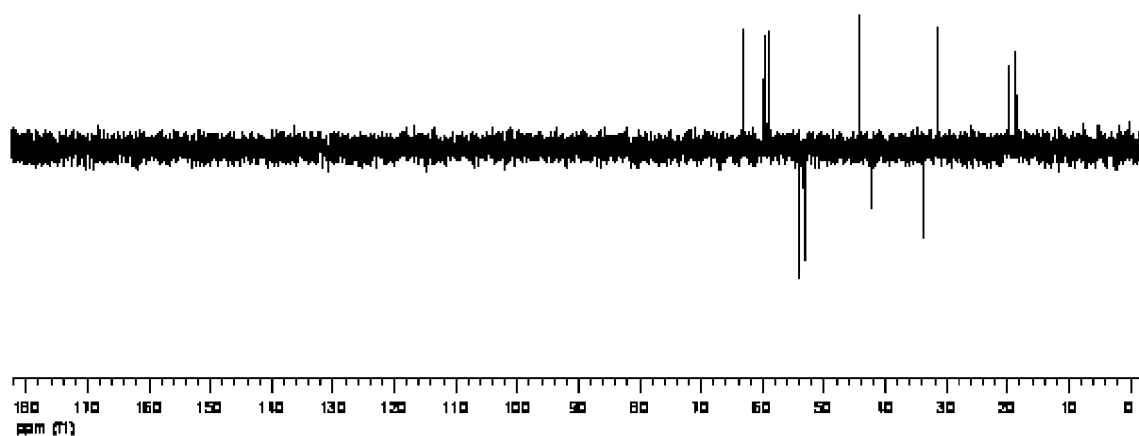
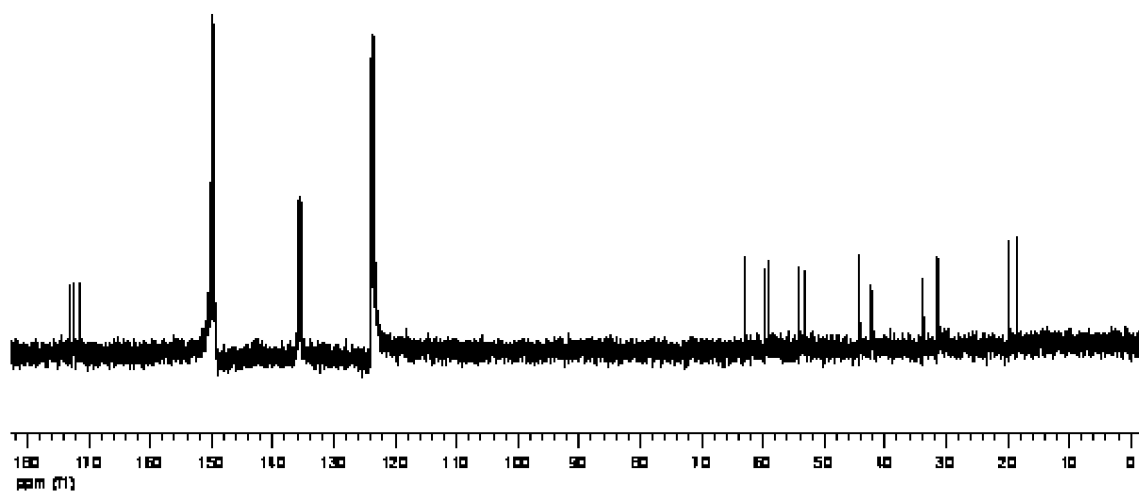
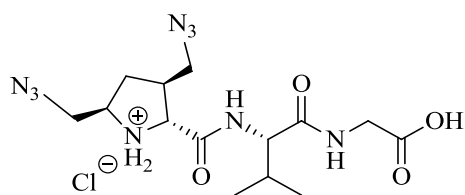
IR ν (cm^{-1}): 3251, 2966, 2103, 1722, 1655, 1543, 1395, 1261, 1116, 1036, 928.

^1H RMN (piridina- d_5) δ (ppm): 9,70 (s an, 2H, intercambian con D_2O , 2 NH), 9,10 (s an, 3H, intercambian con D_2O , $^+\text{NH}_2$ y CO_2H), 5,0 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H, 2- H_{Val}), 4,76 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 4,57-4,46 (m, 1H), 4,41-4,31 (m, 1H), 4,06-3,99 (m, 2H), 3,94-3,87 (m, 1H), 3,85-3,76 (m, 2H), 2,94-2,91 (m, 1H), 2,64-2,58 (m, 1H), 2,33-2,27 (m, 1H), 1,77-1,69 (m, 1H), 1,26-1,18 (m, 6H, 2 CH_3_{Val}).

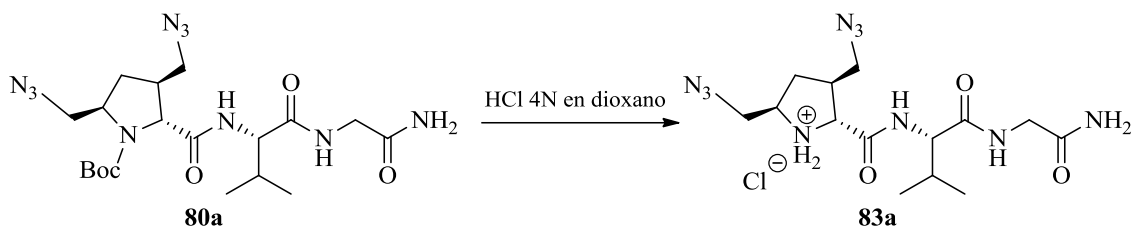
^{13}C RMN (piridina- d_5) δ (ppm): 178,10 (C), 172,41 (C), 171,53 (C), 63,11 (CH_2), 59,76 (CH), 59,06 (CH), 54,06 (CH_2), 53,22 (CH_2), 44,23 (CH), 42,23 (CH_2), 33,78 (CH_2), 31,44 (CH), 19,75 y 18,63 (2 CH_3).

EM-AR (IE-TDV) m/z : Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_9\text{O}_4$: 382,1946. Encontrado: 382,1953.





3.63. Clorhidrato de D-[(3S,5R)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicinamida (83a)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **73a** (véase apartado 3.46) hemos obtenido **83a** a partir de **80a** (60 mg, 0,12 mmol) como un sólido beige (48 mg, 92%) de bajo punto de fusión.

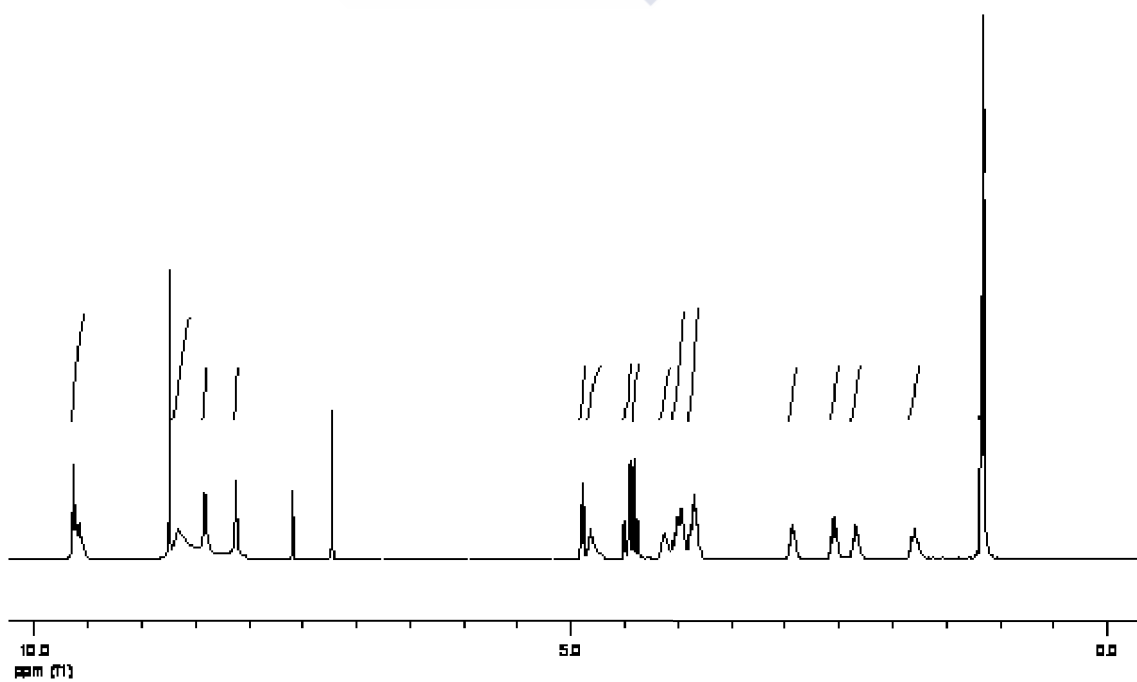
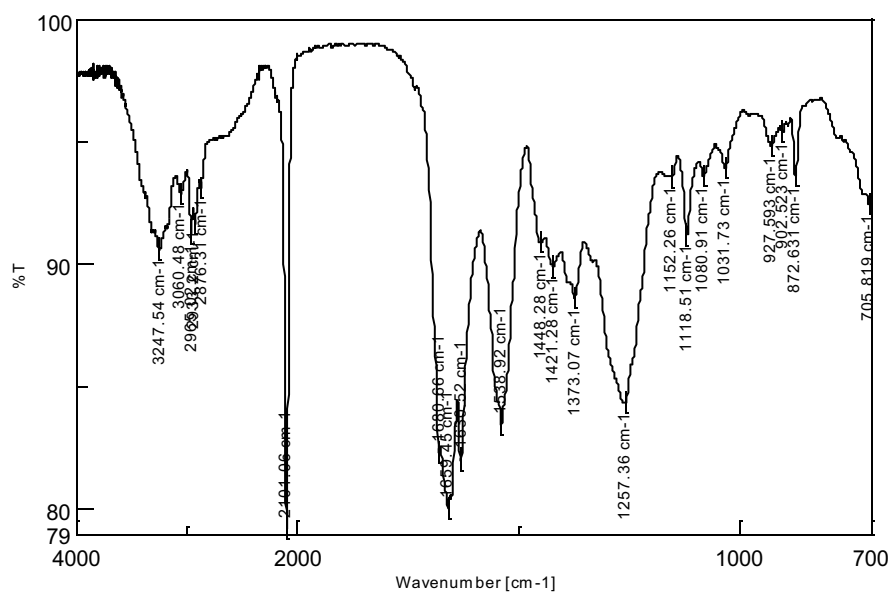
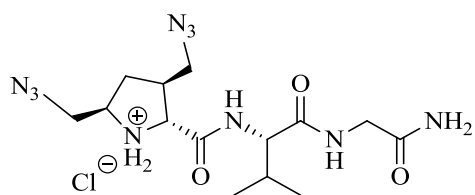
$[\alpha]_D^{25} = -19,58$ (c 0,94, MeOH).

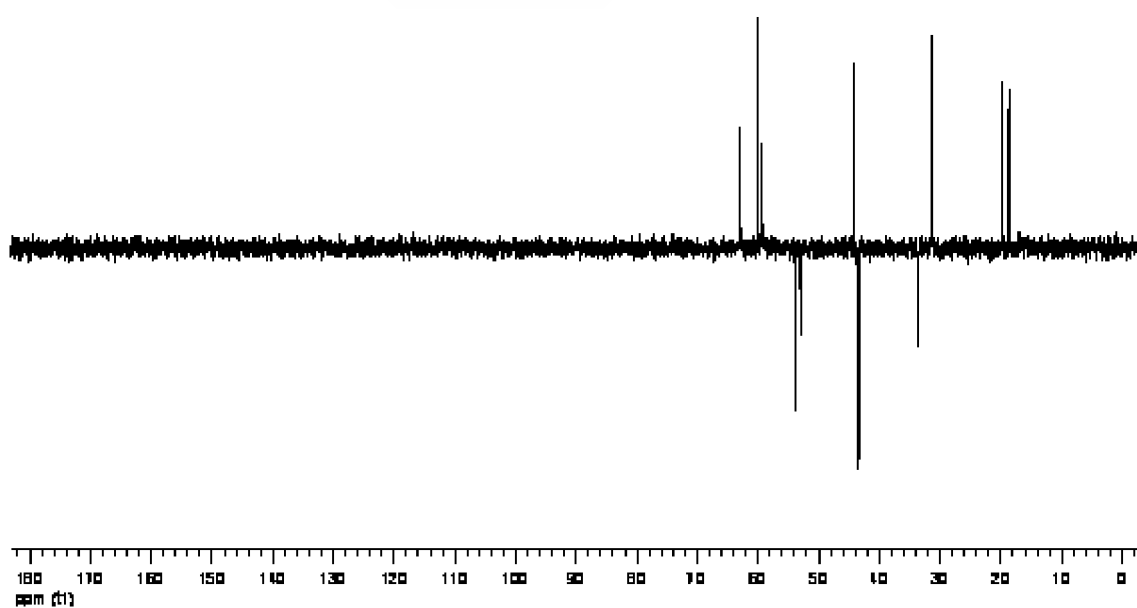
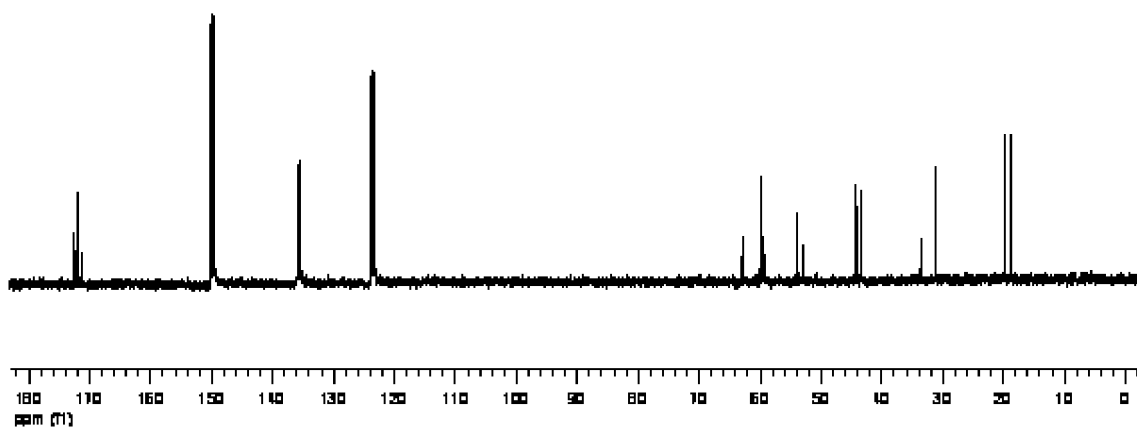
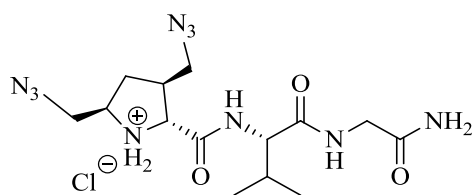
IR v (cm⁻¹): 3248, 2965, 2101, 1681, 1659, 1630, 1539, 1373, 1257, 1118, 873.

¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): [9,64-9,57 (m, 2H), 8,66 (s an, 2H), 8,41 (s an, 1H) y 8,12 (s an, 1H), intercambian con D₂O, 2 NH, NH₂ y ⁺NH₂], 4,92-4,88 (m, 1H, 2-H_{val}), 4,85-4,81 (m, 1H, 2-H_{pro}), 4,48 y 4,40 (parte AB de un sistema AB, $J = 16,4, 6,3, 5,5$ Hz, 2H, 2-H_{Gly}), 4,14-4,04 (m, 1H), 4,04-3,96 (m, 2H), 3,90-3,80 (m, 2H), 2,97-2,89 (m, 1H), 2,57-2,50 (m, 1H), 2,39-2,32 (m, 1H), 1,85-1,77 (m, 1H), 1,19-1,15 (m, 6H, 2 CH₃_{val}).

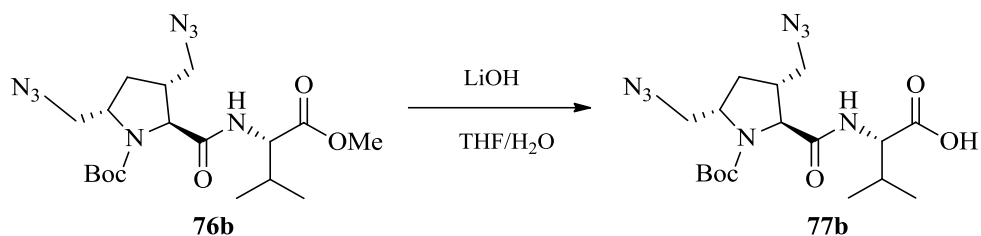
¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 172,48 (C), 172,11 (C), 171,39 (C), 62,92 (CH), 59,97 (CH), 59,37 (CH), 53,90 (CH₂), 52,83 (CH₂), 44,22 (CH), 43,41 (CH₂), 33,61 (CH₂), 31,28 (CH), 19,76 y 18,65 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) m/z : Calculado para C₁₄H₂₅N₁₀O₃: 381,2106. Encontrado: 381,2107.





3.64. L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valina (77b)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **63** (véase apartado 3.34) hemos obtenido **77b** a partir de **76b** (0,40 g, 0,91 mmol) en THF (10 mL) tras 7 h de reacción, como un sólido blanco (0,37 g, 96%), p.f. = 64–66 °C.

$[\alpha]_D^{25} = -9,40$ (*c* 1,0, MeOH).

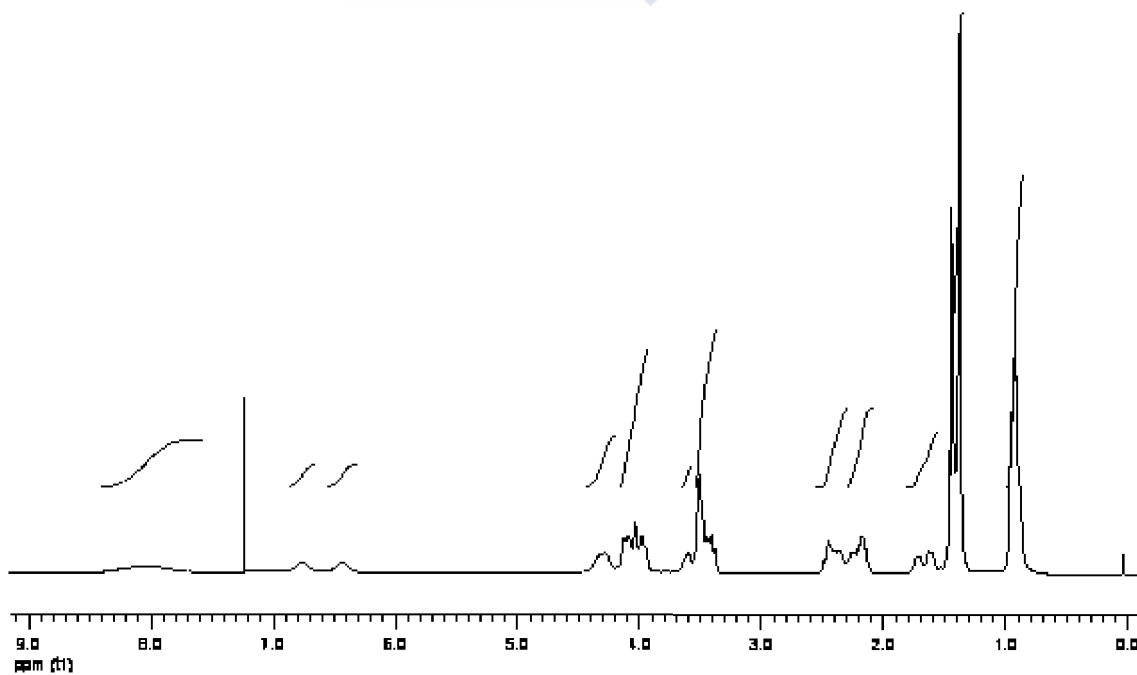
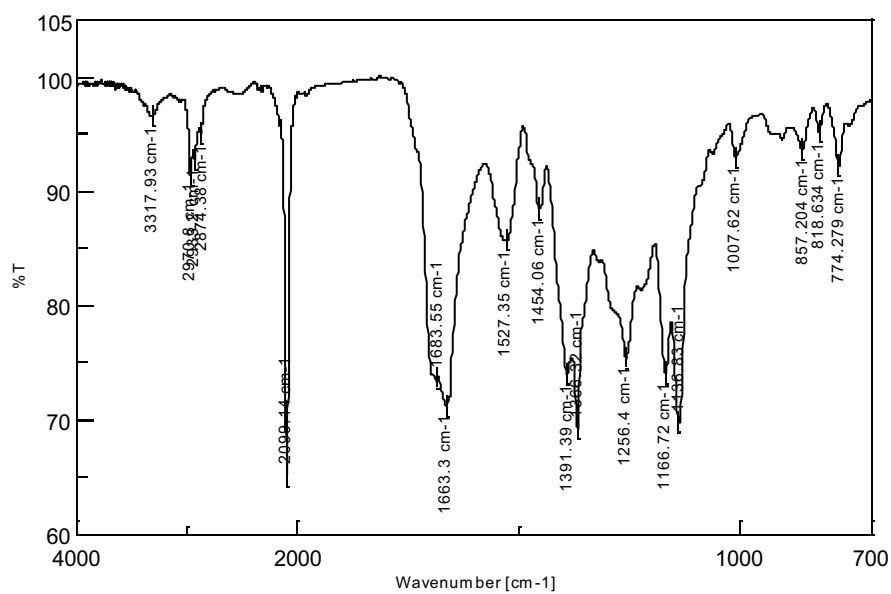
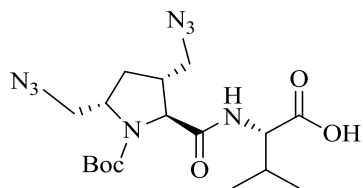
IR v (cm⁻¹): 3318, 2933, 2099, 1683, 1663, 1527, 1391, 1366, 1256, 1167, 1137.

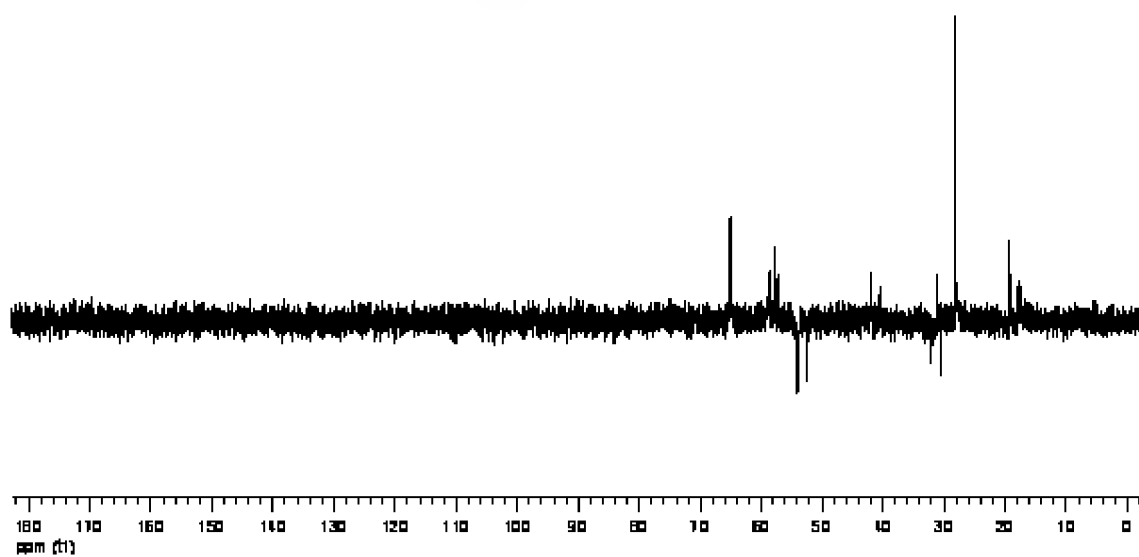
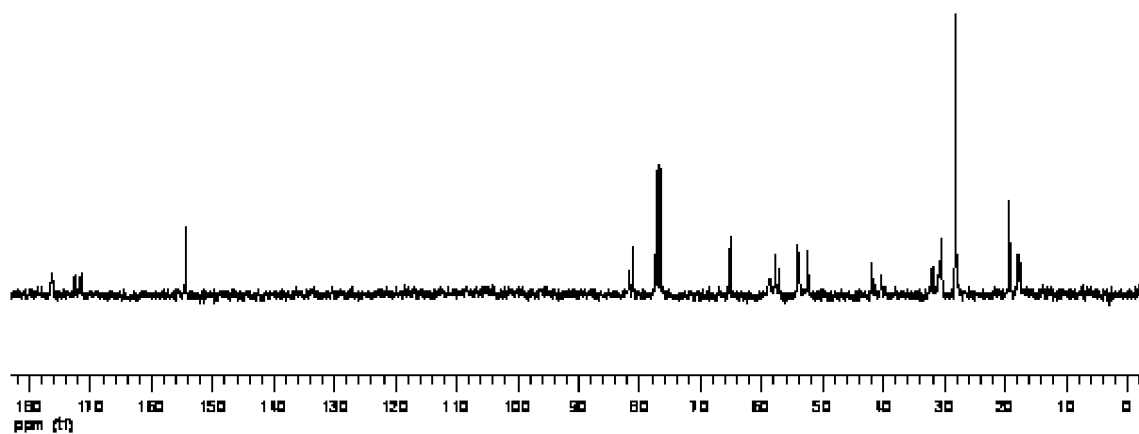
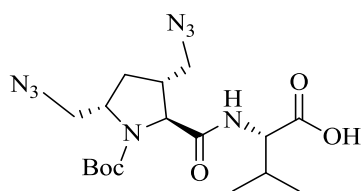
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 8,05 (s an, 1H, intercambia con D₂O, CO₂H), 6,78 y 6,45 (2 s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,37–4,30 (m, 1H), 4,15–3,95 y 3,65–3,59 (2 m, 3H), 3,51–3,36 (m, 3H), 2,52–2,39 y 2,30–2,14 (2 m, 3H), 1,76–1,59 (m, 1H), 1,44, 1,40 y 1,38 (3 s, 9H, 3 CH₃), 0,92 (d, *J* = 5,8 Hz, 6H, 2 CH₃_{Val}).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 176,47 y 176,31 (C), 172,59 y 171,61 (C), 154,40 (C), 81,80 y 81,09 (C), 65,12 (CH), 58,80 y 58,67 (CH), 57,83 y 57,24 (CH), 54,13 y 53,81 (CH₂), 52,46 (CH₂), 41,96 y 40,33 (CH), 32,0 y 30,64 (CH₂), 31,11 (CH), 28,20 (3 CH₃), 19,31, 17,94 y 17,59 (2 CH₃).

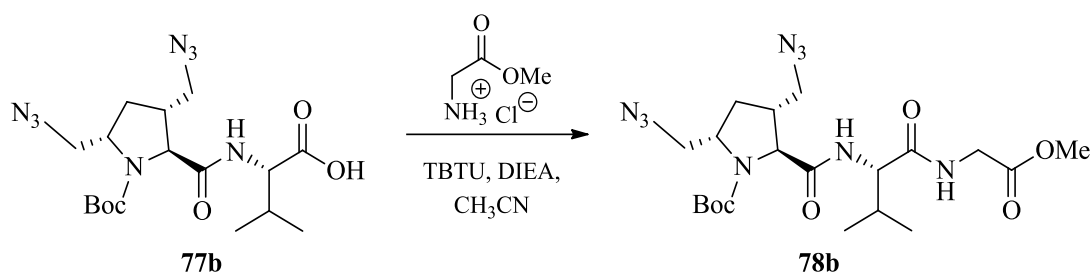
EM-IE-TDV *m/z* (%): 447,2 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₁₇H₂₈N₈O₅ (424,45): C 48,10, H 6,65, N 26,40. Encontrado: C 48,39, H 6,86, N, 26,71.





3.65. L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicinato de metilo (**78b**)



Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.40, hemos preparado **78b** a partir de **77b** (0,37 g, 0,87 mmol) por reacción con clorhidrato de glicinato de metilo (0,13 g, 1,05 mmol) empleando CH₃CN seco (40 mL) como disolvente, tras 15 h de reacción. Tras la elaboración habitual el sólido beige (0,60 g) obtenido, fue sometido a cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando hexano/AcOEt (1:3) como eluyente, aislándose por concentración a vacío de las fracciones que contenían producto, **78b** (0,33 g, 76%) como un sólido blanco, p.f. = 101–103°C.

$[\alpha]_D^{25} = -9,30$ (*c* 0,99, MeOH).

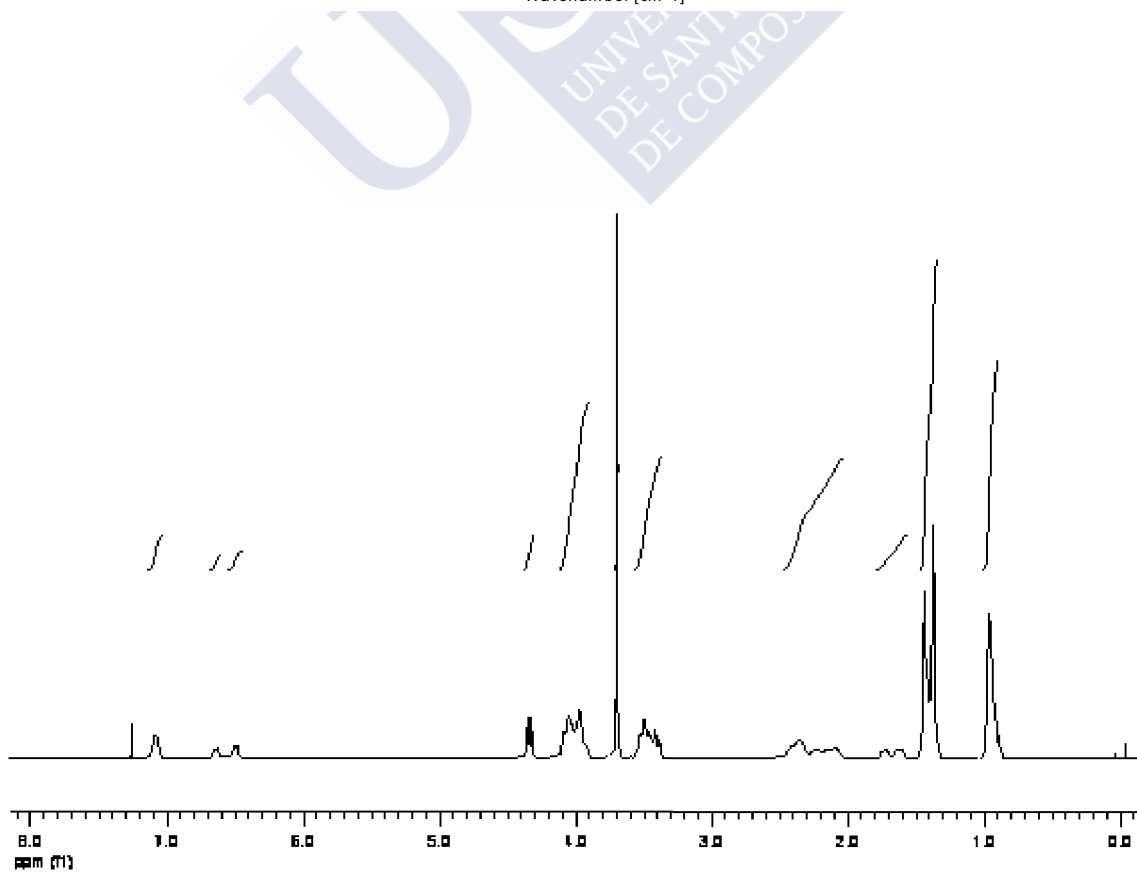
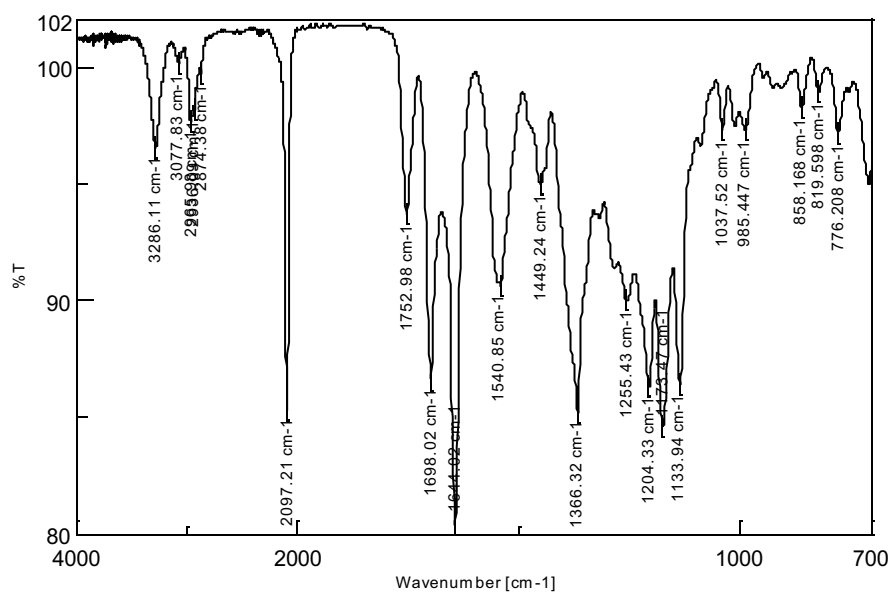
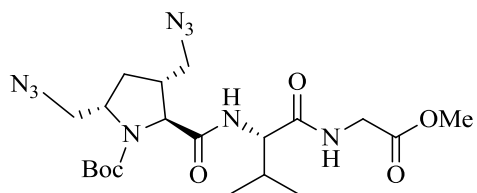
IR v (cm⁻¹): 3286, 2966, 2928, 2097, 1753, 1698, 1644, 1540, 1449, 1366, 1255, 1204, 1173, 1134, 776.

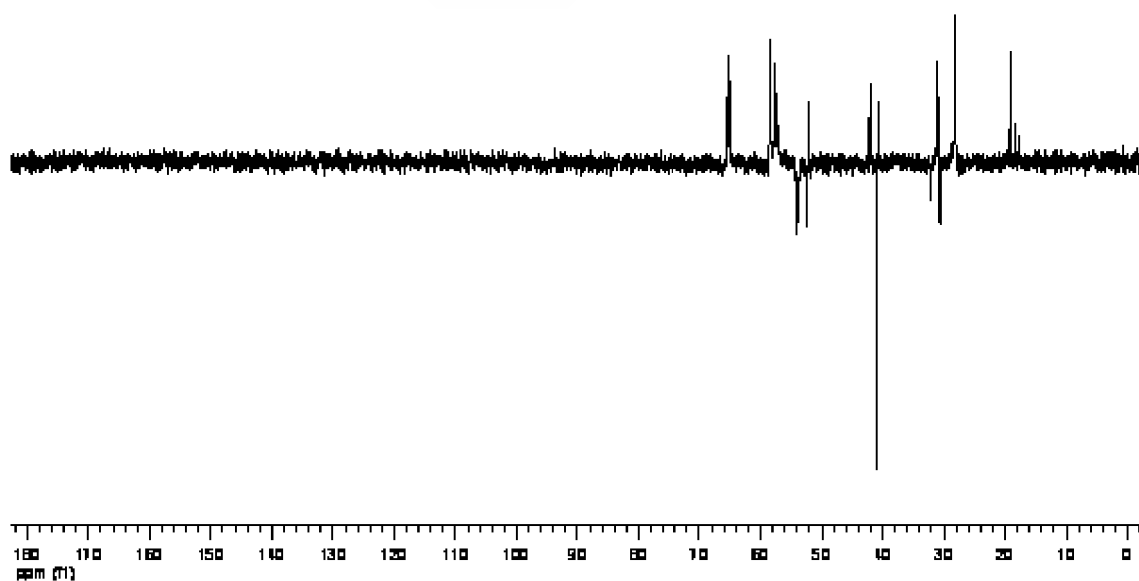
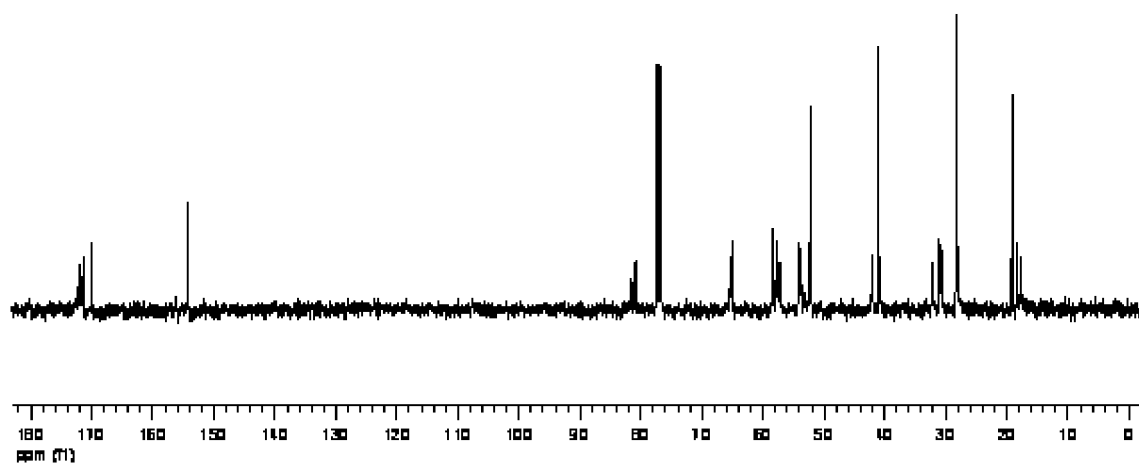
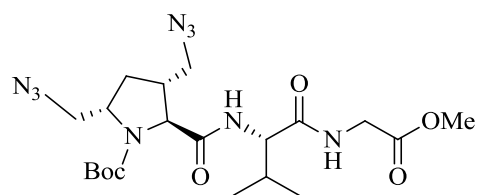
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 7,05 (s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), [6,61 (d, *J* = 7,8 Hz) y 6,46 (d, *J* = 7,4 Hz), 1H, intercambia con D₂O, NH], 4,35–4,31 (m, 1H), 4,09–3,88 (m, 5H), 3,70 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,52–3,38 (m, 3H), 2,41–2,35 y 2,27–2,07 (2 m, 3H), 1,77–1,60 (m, 1H), 1,43, 1,41 y 1,36 (3 s, 9H, 3 CH₃), 0,94 (s an, 6H, 2 CH₃_{val}).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,01 (C), 171,34 y 171,28 (C), 169,95 (C), 154,25 (C), 81,57 y 80,88 (C), 65,41 y 65,11 (CH), 58,46 y 58,36 (C0), 57,74 y 57,27 (CH), 54,18, 53,84, 53,70 y 52,44 (2 CH₂), 52,20 (CH₃), 42,08 y 40,74 (CH), 40,97 (CH₂), 32,10 y 30,65 (CH₂), 31,11 (CH), 28,26 y 28,15 (3 CH₃), 19,13, 18,40 y 17,68 (2 CH₃).

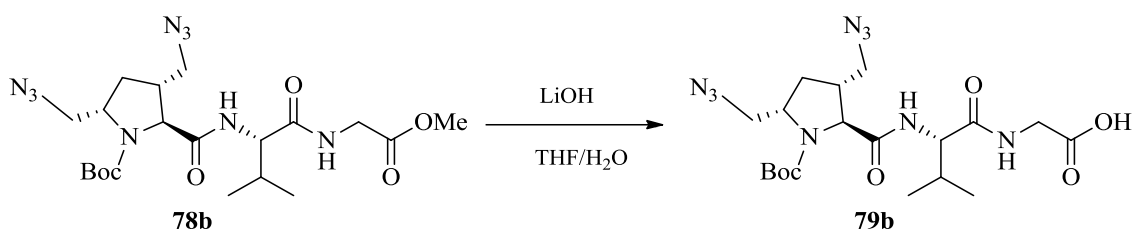
EM-IE-TDV *m/z* (%): 518,2 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para C₂₀H₃₃N₉O₆ (495,53): C 48,48, H 6,71, N 25,44. Encontrado: C 48,74, H 6,99, N, 25,65.





3.66. L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidometil)-1-(*tert*-butoxicarbonil)]prolil-L-valilglicina (79b**)**



Siguiendo el procedimiento en el apartado 3.34, hemos obtenido tras 3 h de reacción, **79b** a partir de **78b** (80 mg, 0,16 mmol), como un sólido blanco (70 mg, 91%), p.f. = 132–134°C.

$[\alpha]_D^{25} = +7,18$ (*c* 1,10, MeOH).

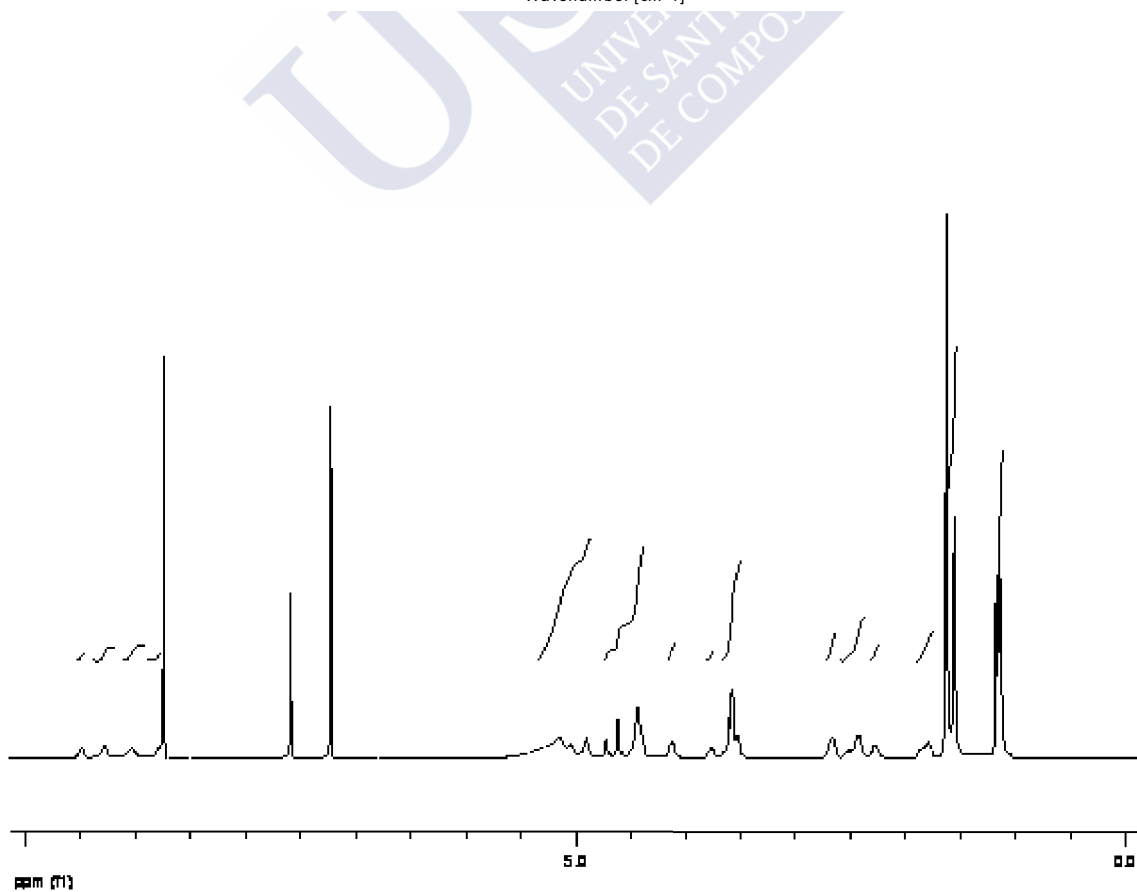
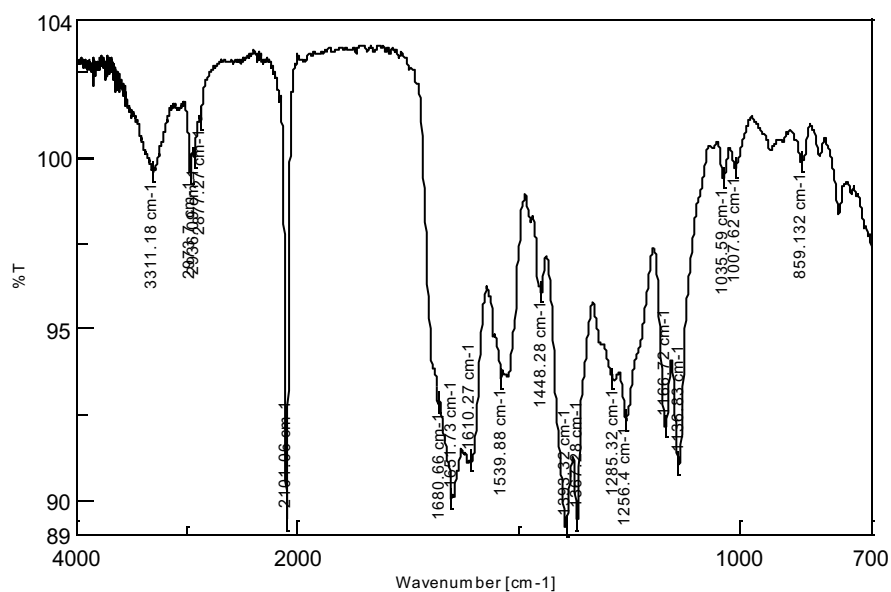
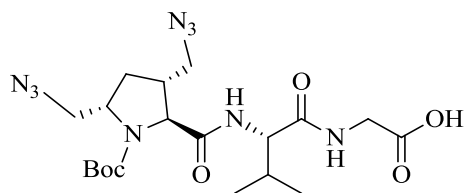
IR v (cm⁻¹): 3311, 2974, 2936, 2101, 1681, 1652, 1610, 1540, 1448, 1393, 1367, 1256, 1167, 1138.

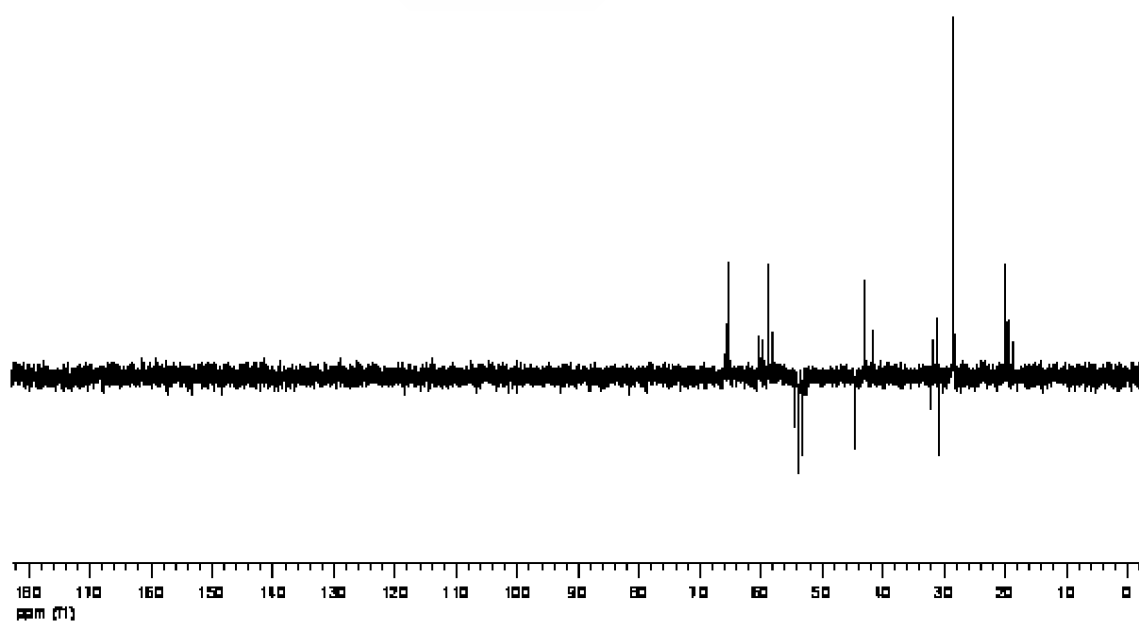
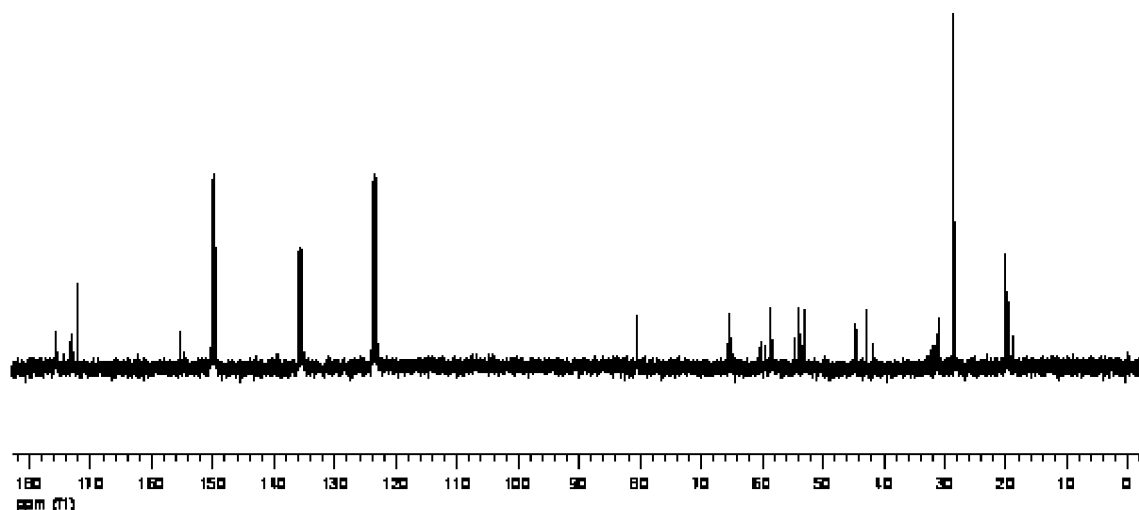
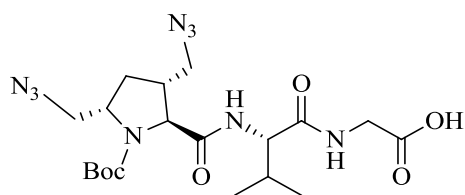
¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 9,48, 9,27, 9,0 y 8,80 (4 s an, 2H, intercambian con D₂O, 2 NH), 5,24-4,90 (m, 4H, uno de ellos intercambia con D₂O, CO₂H), 4,72-4,69, 4,61-4,58, 4,48-4,30 (3 m, 3H), 4,14-4,10, 3,79-3,74 y 3,65-3,52 (3 m, 3H), 2,68-2,61, 2,55-2,40, 2,36-2,25 (3 m, 3H), 1,87-1,77 (m, 1H), 1,62 y 1,55 (2 s, 9H, 3 CH₃), 1,16-1,13 (m, 6H, 2 CH_{3Val}).

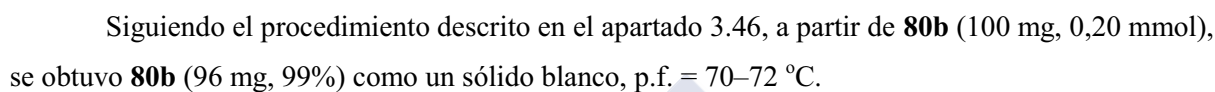
¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 175,72 (C), 173,25 (C), 172,13 (C), 155,26 (C), 80,59 y 80,51 (C), 65,71 y 65,30 (CH), 60,32 y 59,62 (CH), 58,66 y 58,10 (CH), 54,54, 53,90, 53,82 y 53,09 (2 CH₂), 44,61 (CH₂), 42,87 y 41,70 (CH), 32,24 y 30,90 (CH₂), 31,8 y 31,24 (CH), 28,56 y 28,43, (3 CH₃), 19,99, 19,93, 19,51 y 18,83 (2 CH₃).

EM-IE-TDV *m/z* (%): 504,23 [(M + Na)⁺, 77], 448 (20), 426 (24), 382 (100), 351 (24).

Microanálisis. Calculado para C₁₉H₃₁N₉O₆ (481,51): C 47,39, H 6,49, N 26,18. Encontrado: C 47,63, H 6,69, N, 26,35.







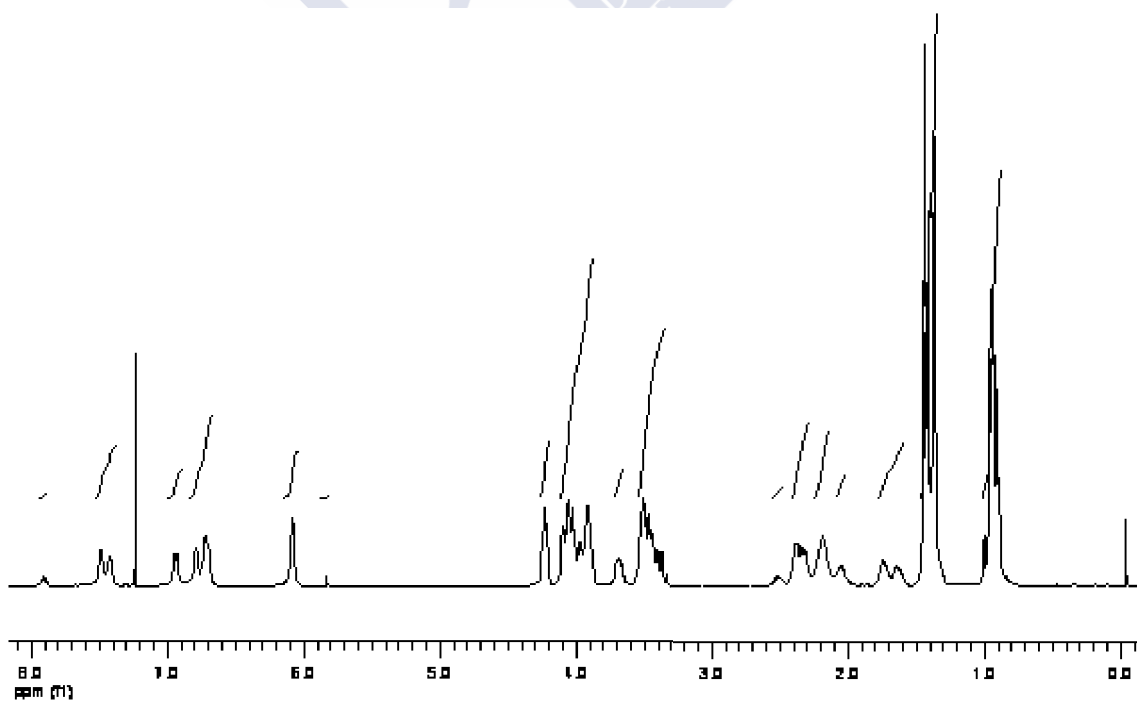
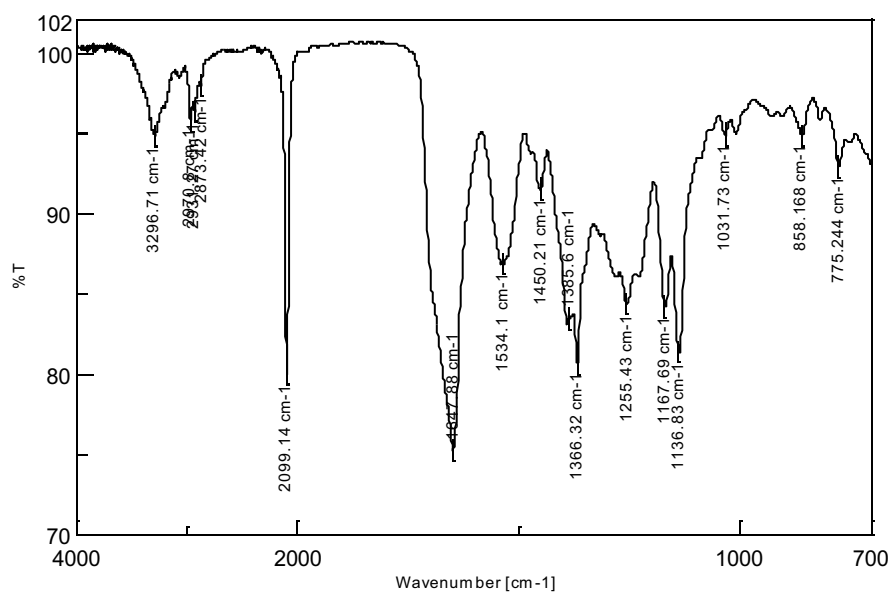
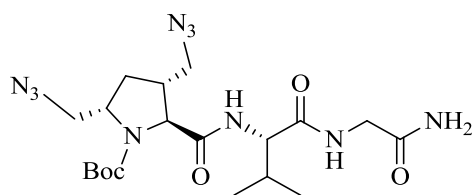
IR ν (cm⁻¹): 3297, 2970, 2931, 2099, 1648, 1534, 1450, 1366, 1255, 1168, 1137, 775.

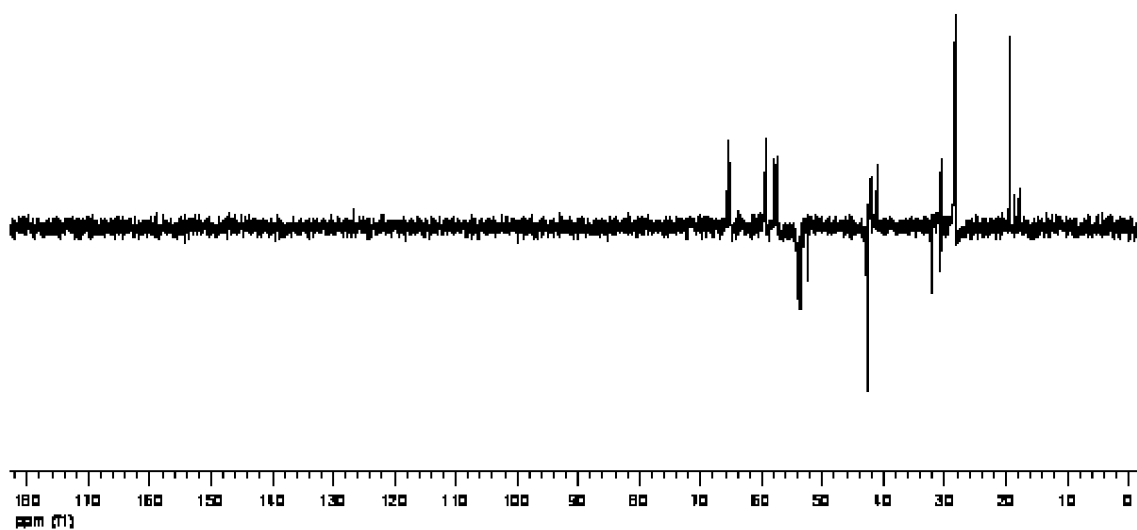
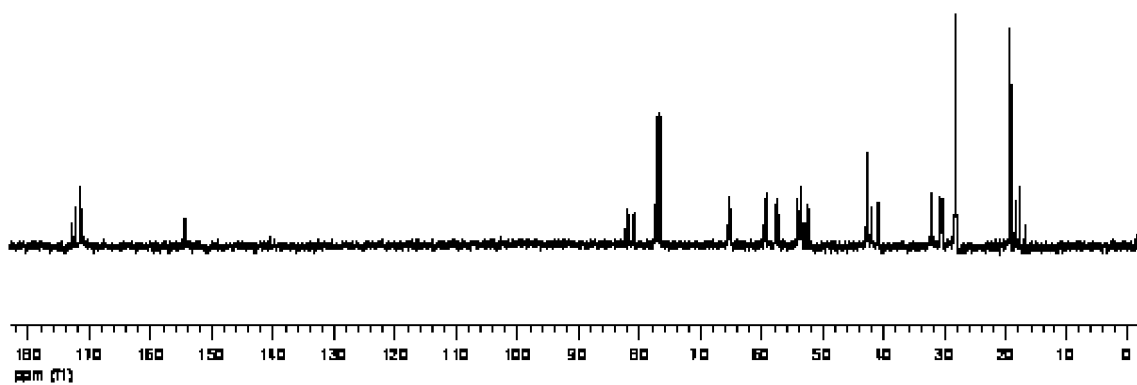
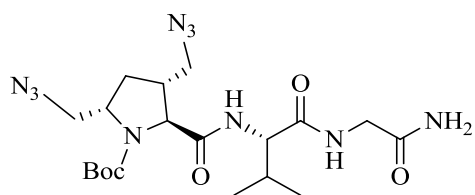
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [7,90 (s an), 7,49-7,42 (2 m), 6,95-6,92 (m) y 6,72-6,79 (m), 4H, intercambian con D₂O, 2 NH y NH₂], 6,08 y 5,84 (2 s an, 1H, intercambia con D₂O, NH), 4,26-4,21 (m, 1H), 4,10-4,01, 3,97-3,90 y 3,71-3,65 (3 m, 5H), 3,51-3,43 (m, 3H), 2,54-2,48, 2,39-2,31, 2,19-2,13 y 2,06-2,01 (4 m, 3H), 1,76-1,70 y 1,67-1,61 (2 m, 1H), 1,44, 1,41 y 1,37 (3 s, 9H, 3 CH₃), 1,01-0,89 (m, 6H, 2 CH_{3Val}).

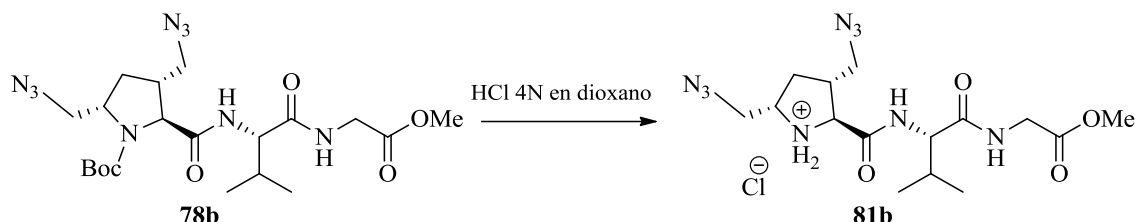
¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 173,02 y 172,86 (C), 172,28 (C), 171,58 y 171,45 (C), 154,43 y 154,30 (C), 81,95 y 80,95 (C), 65,74, 65,40 y 65,10 (CH), 59,68, 59,41 y 59,29 (CH), 57,83, 57,65 y 57,36 (CH), 54,09, 53,68, 53,56, 53,39, 53,04 y 52,44 (2 CH₂), 43,03 y 42,68 (CH₂), 42,10, 41,17 y 40,95 (CH), 32,19 y 30,66 (CH₂), 30,79 y 30,43 (CH), 28,41, 28,33 y 28,21 (3 CH₃), 19,32, 18,56, 17,85 y 16,97 (2 CH₃).

EM-IE-TDV m/z (%): 503,3 [(M + Na)⁺, 100].

Microanálisis. Calculado para $C_{19}H_{32}N_{10}O_5$ (480,52): C 47,49, H 6,71, N 29,15. Encontrado: C 47,83, H 6,99, N, 29,56.







Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.46, hemos preparado **81b** a partir de **78b** (60 mg, 0,12 mmol) como un sólido beige (47 mg, 90%) de bajo punto de fusión.

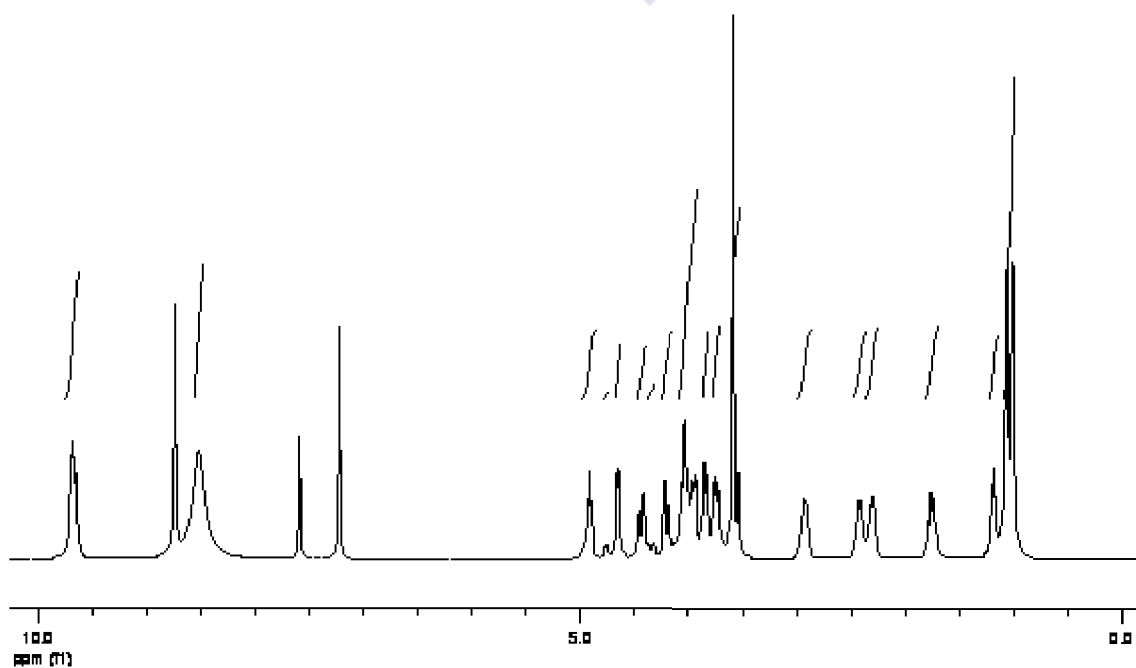
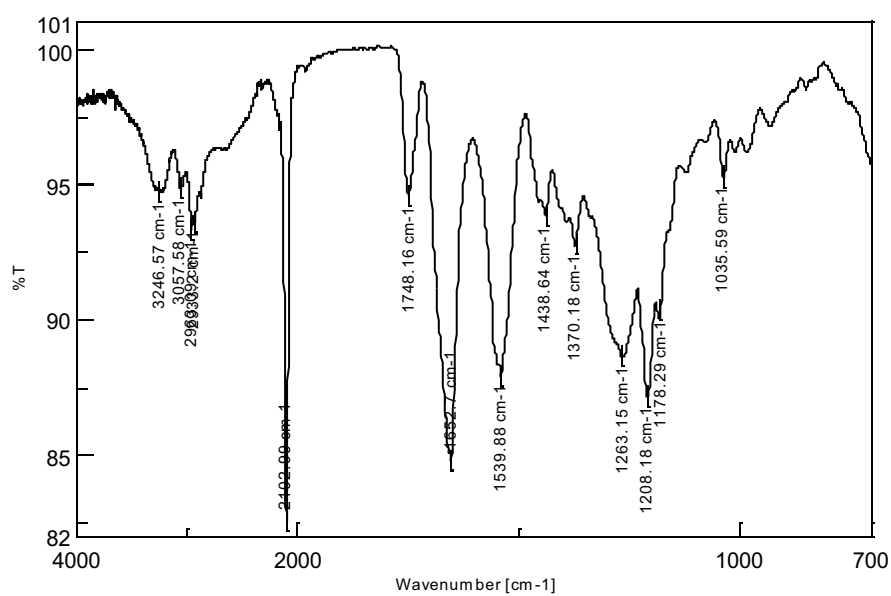
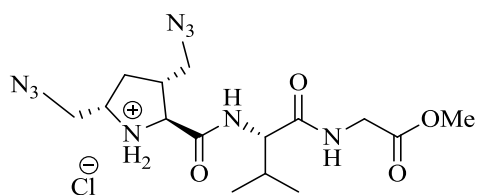
$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +18,61 \text{ (c 1,0, MeOH).}$$

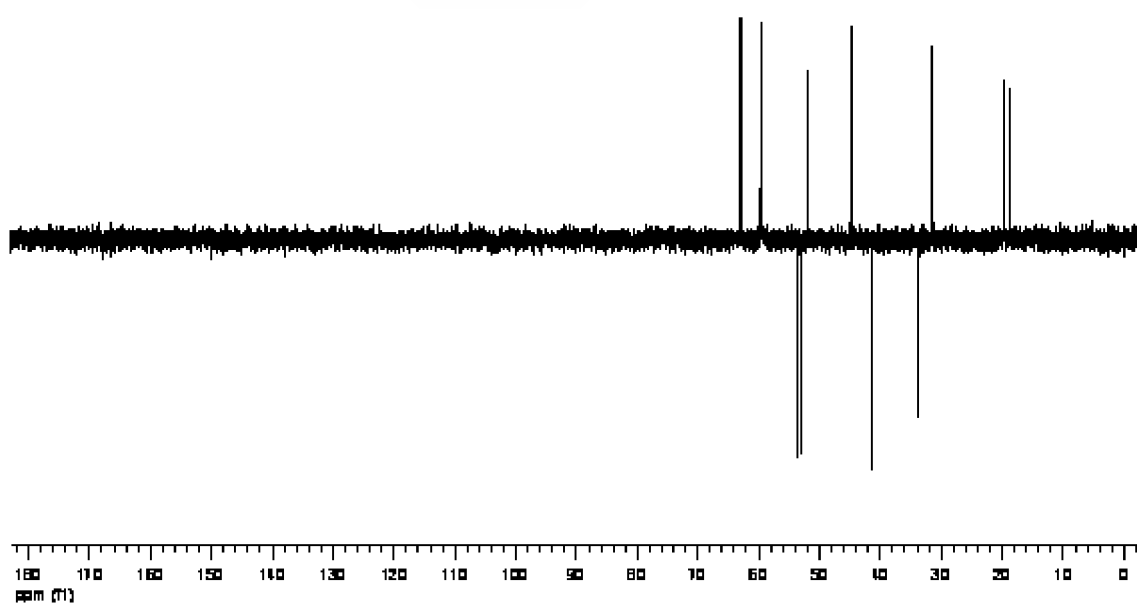
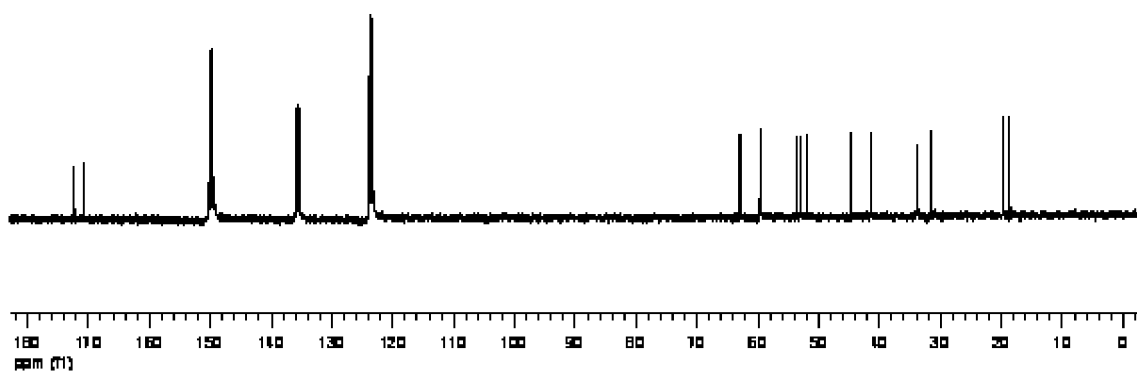
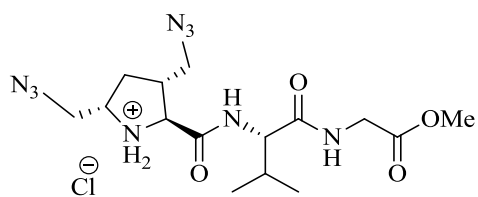
IR ν (cm⁻¹): 3247, 2963, 2103, 1748, 1653, 1540, 1439, 1370, 1263, 1208, 1178, 1036.

¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): 9,69-9,65 (m, 2H, intercambian con D₂O, 2 NH), 8,52 (s an, 2H, intercambian con D₂O, ⁺NH₂), 4,93-4,89 (m, 1H), 4,76 y 4,65 (2 d, *J* = 7 Hz y *J* = 7 Hz, 1H), [4,44 (dd, *J* = 17,2, 5,5 Hz) y 4,35 (d, *J* = 17,2 Hz), 1H], 4,23-4,18 (m, 1H), 4,06-3,92 (m, 3H), 3,85-3,82 (m, 1H), 3,77-3,72 (m, 1H), 3,58 y 3,54 (2 s, 3H, CO₂CH₃), 2,93-2,91 (m, 1H), 2,44-2,39 (m, 1H), 2,35-2,30 (m, 1H), 1,79-1,74 (m, 1H), [1,20-1,17 (m), 1,06 y 1,0 (2 d, *J* = 6,2 Hz y *J* = 6,2 Hz), 6H, 2 CH_{3Val}].

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 172,47 (C), 170,89 (C), 170,77 (C), 62,98 (CH), 59,67 (CH), 59,47 (CH), 53,56 (CH₂), 52,95 (CH₂), 51,87 (CH₃), 44,69 (CH), 41,49 (CH₂), 33,97 (CH₂), 31,51 (CH), 19,67 y 18,59 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₁₅H₂₆N₉O₄: 396,2103. Encontrado: 396,2101.





3.69. Clorhidrato de L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicina (**82b**)



Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.46, hemos obtenido **82b** a partir de **79b** (50 mg, 0,10 mmol) como un sólido beige (37 mg, 85%) de bajo punto de fusión.

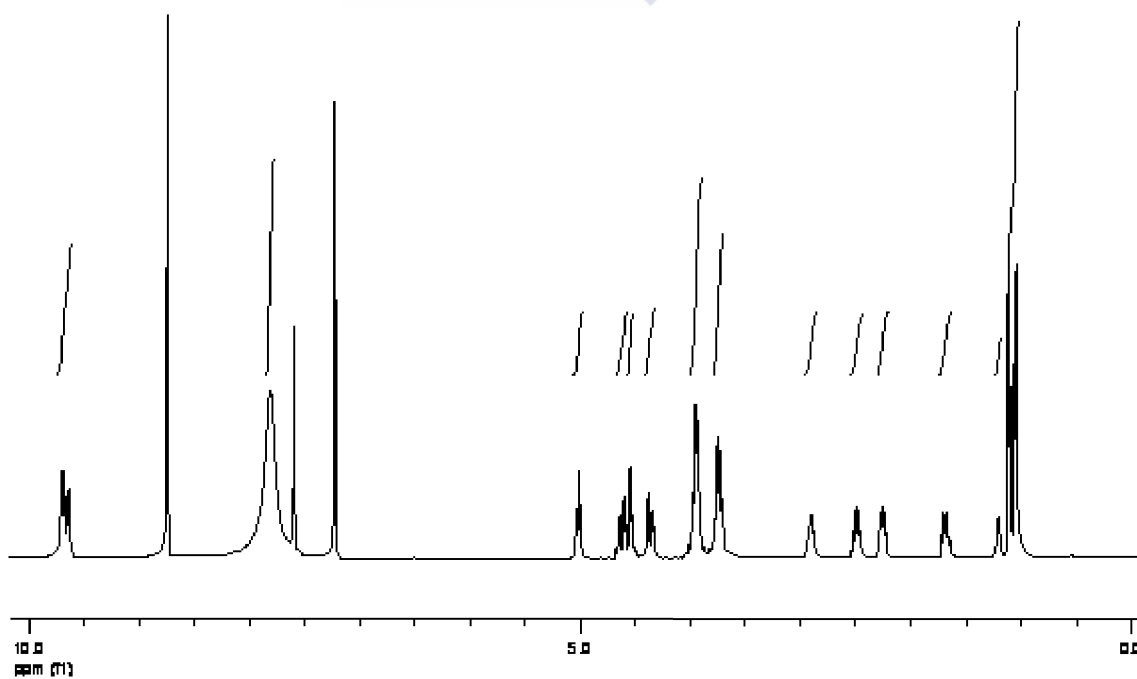
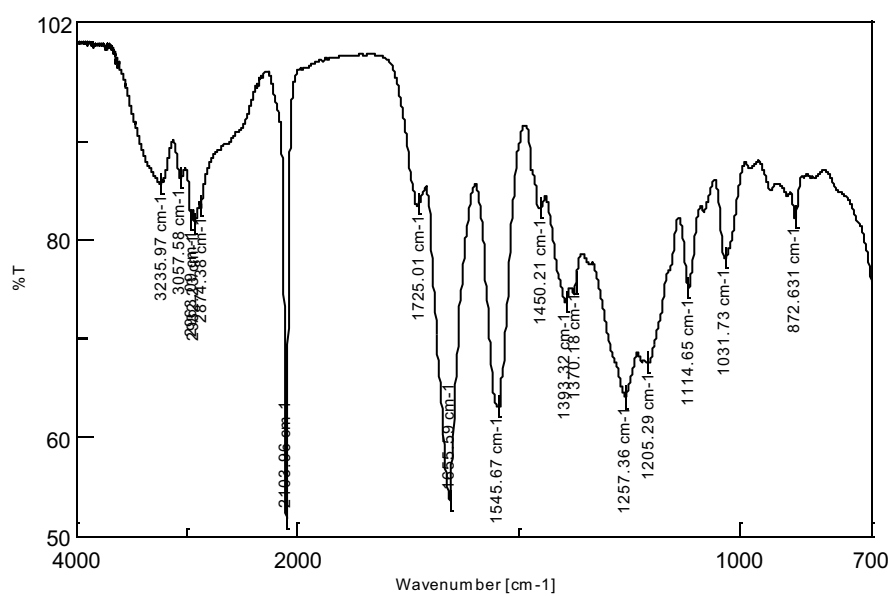
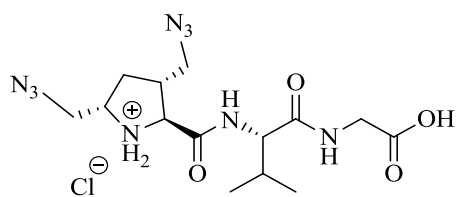
$[\alpha]_D^{25} = +4,60$ (c 0,98, MeOH).

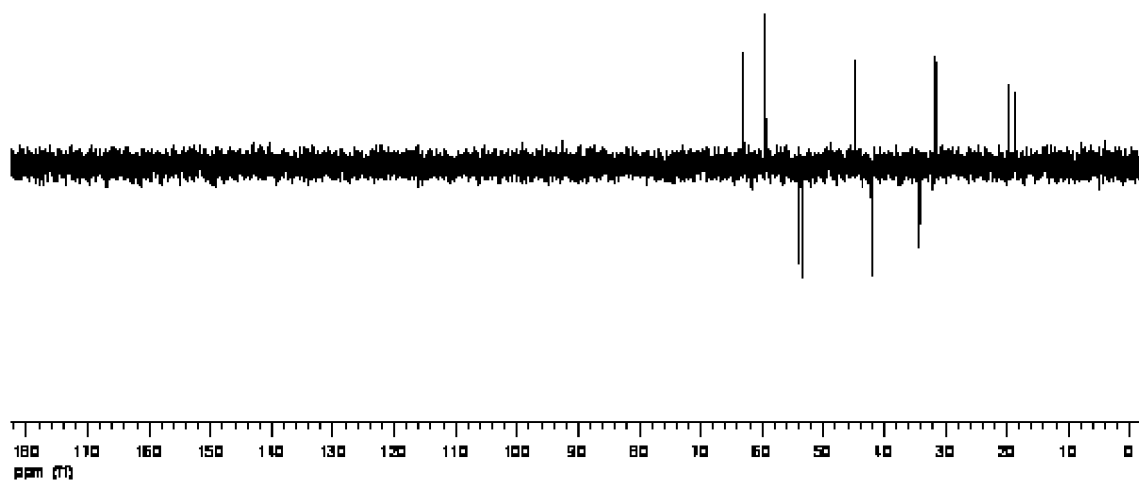
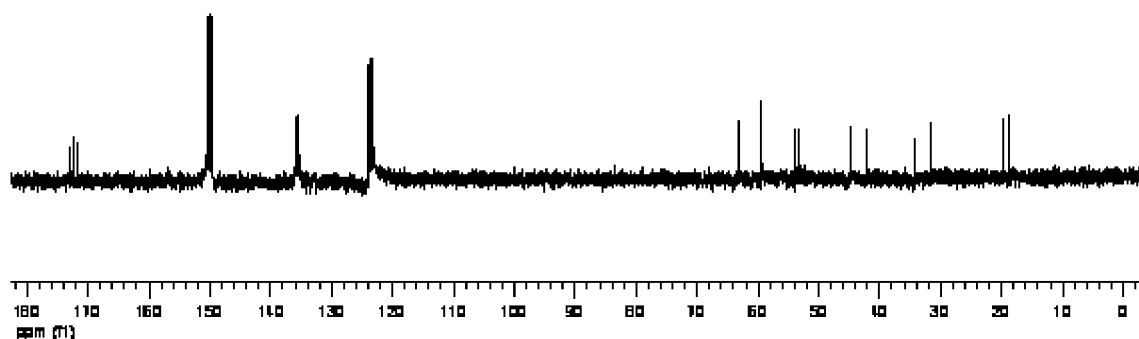
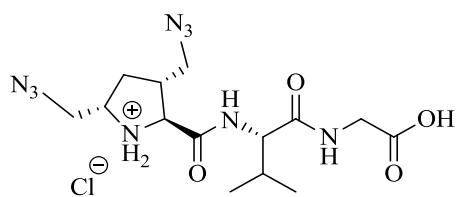
IR v (cm⁻¹): 3236, 3058, 2963, 2104, 1725, 1656, 1546, 1393, 1257, 1205, 1114, 1032.

¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros □: 9,70-9,63 y 7,81 (m y s an, 5H, intercambian con D₂O, 2 NH, ⁺NH₂, CO₂H), 5,04-5,0 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4,68-4,50 (m, 2H), 4,37 (dd, $J = 17,2, 5,5$ Hz, 1H), 4,0-3,93 (m, 3H), 3,78-3,68 (m, 2H), 2,94-2,87 (m, 1H), 2,53-2,45 (m, 1H), 2,29-2,23 (m, 1H), 1,72-1,65 (m, 1H), 1,22-1,20 y 1,08 (m y dd, $J = 24,2, 6,3$ Hz, 6H, 2 CH₃_{Val}).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 172,90 (C), 172,49 (C), 171,55 (C), 63,19 (CH), 59,45 (2 CH), 53,90 (CH₂), 53,41 (CH₂), 44,85 (CH), 42,07 (CH₂), 34,26 (CH₂), 31,64 (CH), 19,77 y 18,69 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₁₄H₂₄N₉O₄: 382,1946. Encontrado: 382,1950.





3.70. Clorhidrato de L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidometil)]prolil-L-valilglicinamida (**83b**)



Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.46, hemos obtenido **83b** a partir de **80b** (60 mg, 0,12 mmol) como un sólido beige (50 mg, 96%) de bajo punto de fusión.

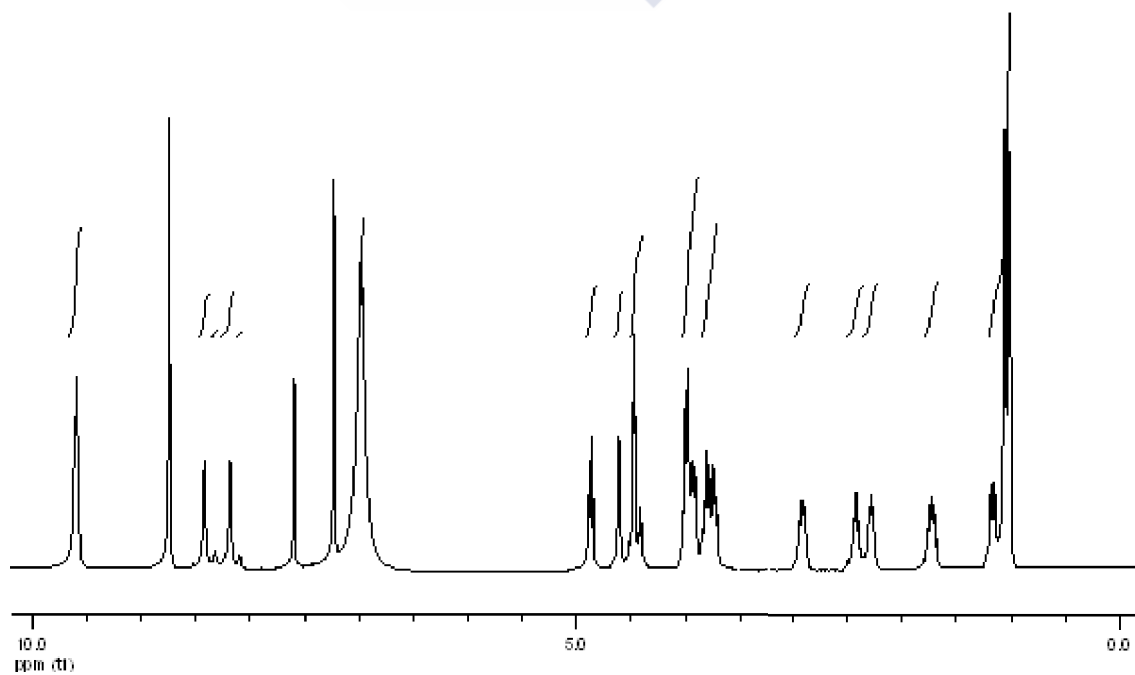
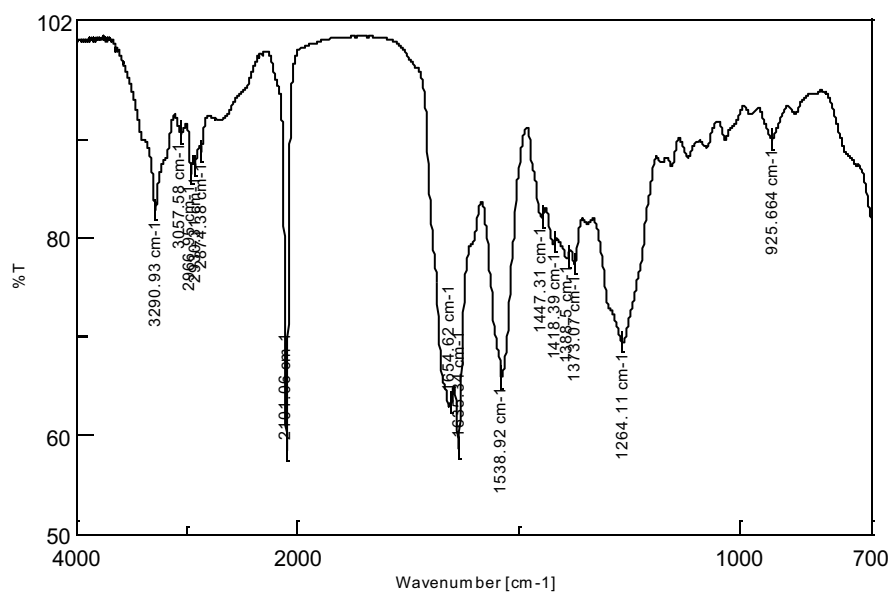
$[\alpha]_D^{25} = +21,62$ (*c* 1,11, MeOH).

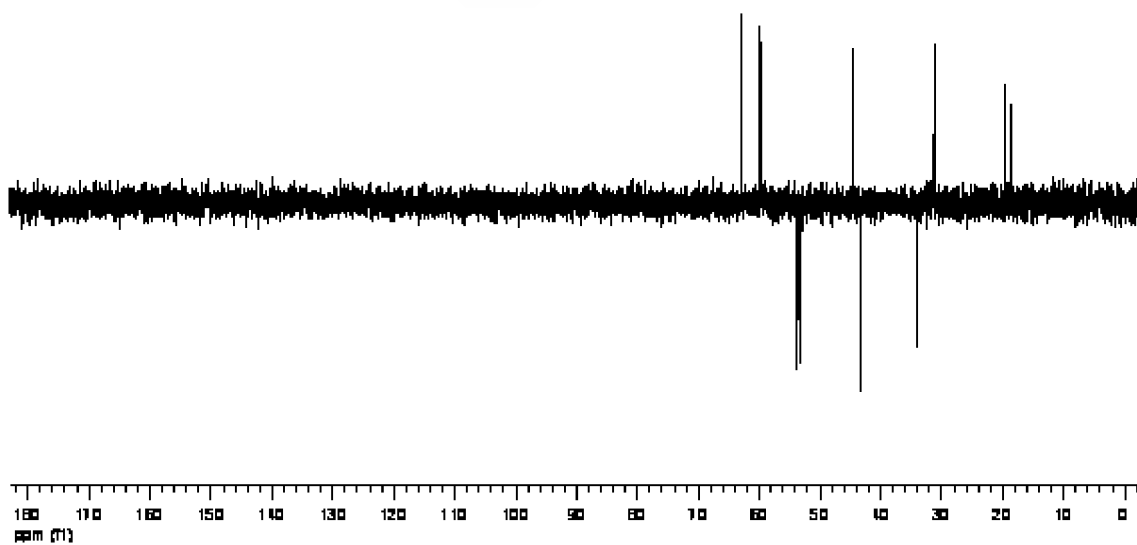
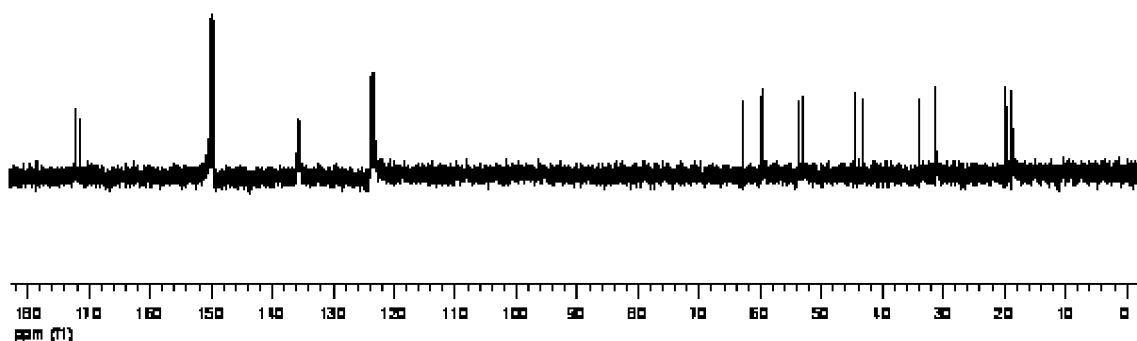
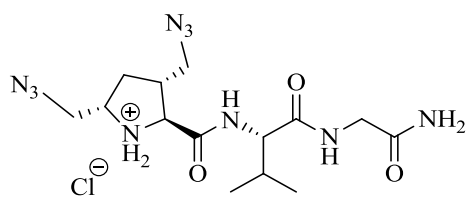
IR v (cm⁻¹): 3291, 2966, 2101, 1655, 1635, 1539, 1373, 1264.

¹H RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm) (se observa la presencia de rotámeros): [9,61-9,59 (m), 8,41, 8,32, 8,18, 8,09 y 6,98 (5 s an), 6H, intercambian con D₂O, 2 NH, NH₂ y ⁺NH₂], 4,88-4,84 (m, 1H, 2-H_{Val}), 4,61(d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 2-H_{Pro}), [4,48 (t, *J* = 4,6 Hz), 4,43-4,40 (m), 2H, 2-H_{2Gly}], 4,09-3,90 (m, 3H), 3,84-3,71 (m, 2H), 2,95-2,88 (m, 1H), 2,46-2,38 (m, 1H), 2,33-2,24 (m, 1H), 1,76-1,68 (m, 1H), 1,16-1,10 (m, 6H, 2 CH_{3Val}).

¹³C RMN (piridina-*d*₅) δ (ppm): 172,30 (C), 172,23 (C), 171,45 (C), 62,96 (CH), 60,0 (CH), 59,61 (CH), 53,66 (CH₂), 53,11 (CH₂), 44,65 (CH), 43,26 (CH₂), 33,97 (CH₂), 31,26 (CH), 19,73 y 18,75 (2 CH₃).

EM-AR (IE-TDV) *m/z*: Calculado para C₁₄H₂₅N₁₀O₃: 381,2106. Encontrado: 381,2126.







4. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS



4.1. ENSAYOS DE COMPETICIÓN AGONISTA/ANTAGONISTA DEL RECEPTOR D₂ DE DOPAMINA

4.1.1. Material y métodos

Los experimentos de competición agonista/antagonista utilizando la técnica de fijación de ligandos (o "binding"), necesarios para determinar el efecto como moduladores alostéricos de receptores D₂ de dopamina de los análogos de PLG sintetizados en esta Memoria, han sido realizados en la **Unidad de Avaluación de Actividades Farmacológicas de Compuestos Químicos** de la Universidade de Santiago de Compostela.

4.1.1.1. Preparación de membranas

Para ello, se emplearon receptores humanos transfectados en la línea celular de ovario de hámster chino expresada sobre células humanas de receptores D₂, dispuestas en placas Petri de 150 mm en el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (EMEM-F12) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% dializado. Cuando las células se encontraron a confluencia (es decir, tapizando la base de la placa de Petri sin llegar a diferenciarse), se eliminó el medio y las células se lavaron dos veces con la disolución tampón A [clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) 5 mM, pH=7,4 y ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 2 mM]. Las células se resuspendieron por raspado y se homogenizaron en el Polytron (ajuste 10, dos pulsos de 15 segundos). La suspensión de las células se centrifugó (1100 g, 10 min, 4 °C). El sobrenadante se centrifugó (48400 g; 4 °C; 60 min) y el péllet resultante de la centrifugación se resuspendió en la disolución tampón B (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4) y se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford.³³⁸

4.1.1.2. Ensayos de unión al receptor D₂ humano

Las membranas expresando el receptor D₂ humano (30 µg/pocillo) se incubaron con una disolución de [³H]NPA 0,25 nM (concentración final) y se ensayaron los compuestos durante 60 min a 25 °C en 96 pocillos de polipropileno con un tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,6; NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 4 mM, EDTA 1 mM) hasta un volumen total de 250 µL. La unión inespecífica se determinó en presencia de (+)-butaclamol 1 µM.

Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron 200 µL a una microplaca Millipore GF/C, pretratada con polietilenimina al 0,5% y las muestras se filtraron y se lavaron 4 veces con 250

³³⁸ Bradford, M. M. *Anal Biochem.* **1976**, 72, 248.

μL de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,6; NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 4 mM, EDTA 1 mM). Los filtros se secaron y se añadieron en cada pocillo 30 μL de cóctel de centelleo. (Universol) y la radiactividad se detectó mediante un contador de centelleo (Microbeta Trilux), para lectura de microplacas.

Los datos se expresaron como incremento de la especificidad de la unión, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Incremento} = \left(\frac{(X - NSB) * 100}{BT - NSB} \right) - 100$$

donde X es la radioactividad detectada en el pocillo ensayado; BT es la radioactividad detectada cuando [³H]NPA se incubó en ausencia de compuesto y NSB es la radioactividad detectada cuando [³H]NPA se co-incubó con (+)-butaclamol 1 μM.

La significación estadística se evaluó mediante un análisis ANOVA empleando el software SPSS (V15.0) y se determinó el umbral de significación en valores de $P < 0,05$.

4.1.1.3. Resultados

Sobre once nuevos compuestos prolina-miméticos de PLG, **73a–75a**, **73b**, **75b**, **81a–83a** y **81b–83b**, previamente sintetizados, se realizaron ensayos de su capacidad para potenciar la unión del agonista [³H]NPA a receptores de dopamina D₂ clonados, tal como describen Verma y col.⁴³

Estos compuestos se ensayaron a tres diferentes concentraciones, 0,01, 0,1, y 1 nM. Los datos obtenidos para los análogos de la PLG sobre la unión de [3H]NPA, se indican en la figura 31.

⁴³ Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J. M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Fair, V. D.; Mishra, R. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1228.

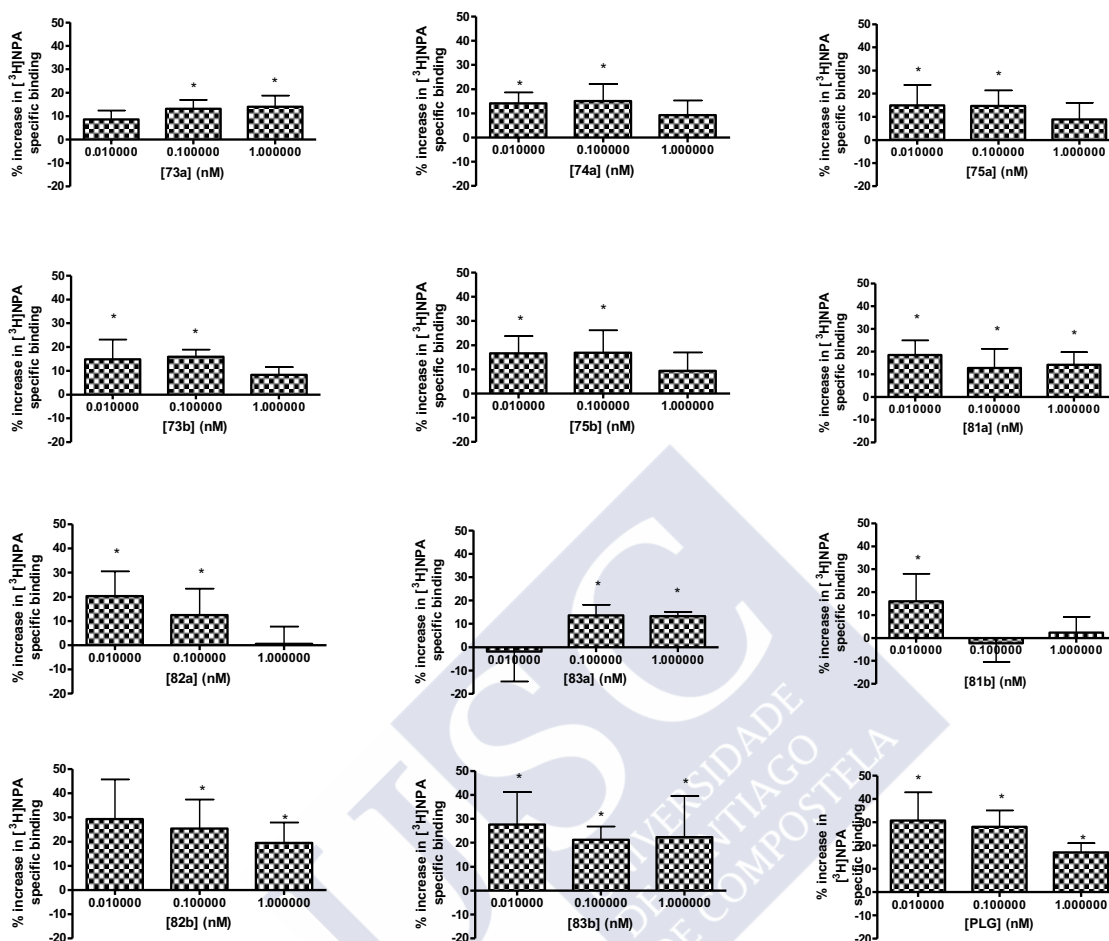


Figura 31. Modulación de la unión de $[^3\text{H}]\text{NPA}$ ejercida por los compuestos **73a-75a**, **73b**, **75b**, **81a-83a**, **81b-83b** y **PLG** a concentraciones 10^{-11} , 10^{-10} y 10^{-9} M. Las columnas representan la medida \pm de la desviación estándar (barras verticales) de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * ($P < 0,05$; ensayo ANOVA; ensayo de post hoc Dunnett T3).

Todos los compuestos ensayados indujeron un aumento significativo ($P < 0,05$; ensayo ANOVA; ensayo de post hoc Dunnett T3) en la unión de la $[^3\text{H}]\text{NPA}$ a los receptores humanos transfectados previamente preparados, al menos a una de las concentraciones evaluadas. De los nuevos compuestos, **82b** y **83b** fueron los que mostraron perfiles más similares a PLG, con aumentos de unión de la $[^3\text{H}]\text{NPA}$ al receptor D_2 de dopamina, que oscilan entre el 30% y el 40%. Ante estos resultados se realizaron nuevos ensayos con estos dos compuestos y PLG, estudiando 8 diferentes concentraciones (entre 10^{-12} y 10^{-5} M) (Figura 32).

Así, los compuestos **82b** y **83b** mostraron incrementos de la unión en torno al 40%, similares a los observados con la PLG. En estos análogos las modificaciones estructurales, incluyen no solo la sustitución del resto de prolina por el prolina-mimético **65**, sino que además, el resto de L-Leucina se

intercambia por la L-valina, homólogo inferior de la misma. Estos resultados inducen a establecer una primera consecuencia del estudio de relación estructura actividad de la serie diseñada: una disminución del tamaño molecular en el resto aminoacídico intermedio con respecto al PLG de las moléculas preparadas, favorece la unión de la [^3H]NPA a los receptores D_2 de dopamina.

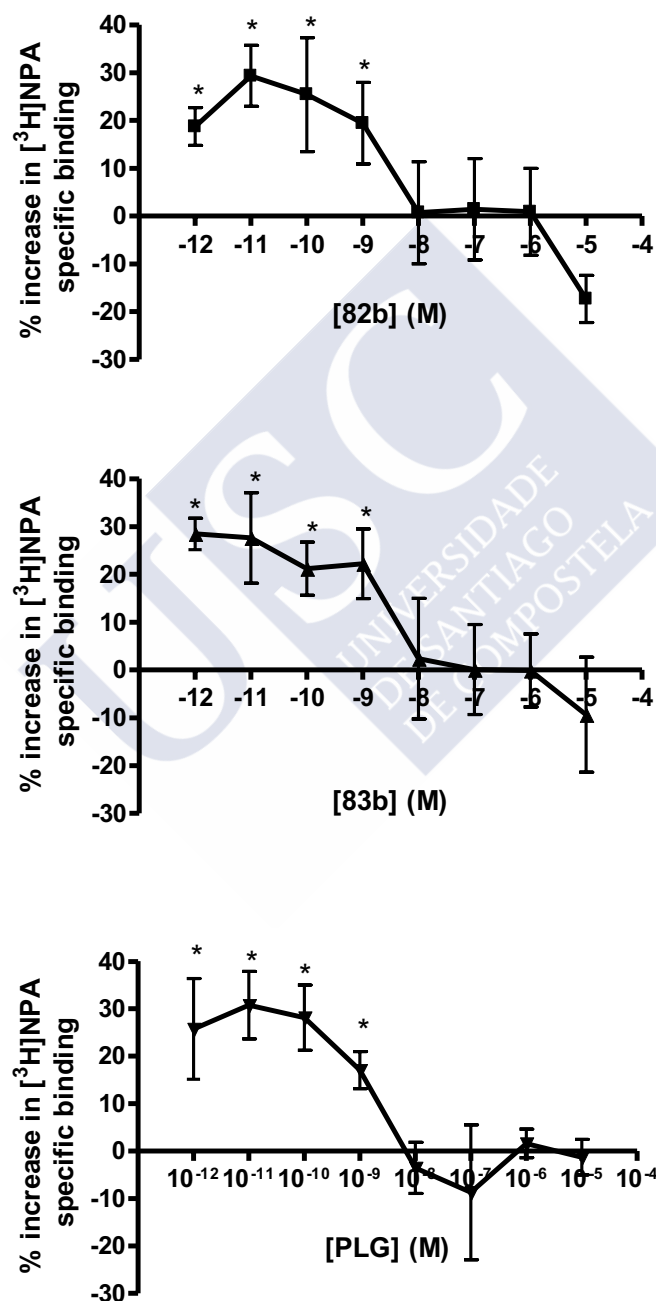


Figura 32. Efecto modulador de la unión de la [^3H]NPA ejercido por **82b**, **83b** y **PLG** a 8 concentraciones diferentes en un intervalo de entre 10^{-12} - 10^{-5} M. Los puntos representan la medida \pm de la desviación estándar (barras verticales) de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.05$ (ensayo ANOVA; ensayo de post-hoc Dunnett T3).



5. CONCLUSIONS



1- We have developed a synthetic method, which is a contribution to the enlargement of the pool of available proline-like structures currently very active field with the aim of obtaining new proline mimetic therapeutic agents. While exploring synthetic approaches to 3,5- disubstituted prolines from a readily available *N*-benzyl protected derivative, **15**, we found that *N*-Boc derivatives are better intermediates than *N*-benzyl derivatives in terms of cleanness and overall yield of the synthetic procedure, as it can be seen comparing reaction sequence (**15**→**22**→**38**→**16**→**46a**) with (**15**→**35**→**36**→**45**). In addition, a variety of functional group modifications of the hydroxymethyl groups of **15** have been carried out, thus enabling the preparation of compounds, for example compounds **30–32**, **40**, **41**, **42b**, **43b**, **44**, **46b** and **46c**, showing diol **15** as a versatile synthon for the preparation of a variety of 3,5-disubstituted proline mimetics.

2- In this work illustrates how readily available substrates can be directly converted into potential drugs by combination of tandem and sequential processes. Thus, 3,5-disubstituted proline derivative **31** was transformed into 1'-*homoisoazanucleoside* **47–54** using the microwave-assisted 1,3-dipolar cycloaddition methodology and the reduction of **31** allows through its transformation into the amino alcohol **32**, the formation of other 1'-*homoisoazanucleoside* carriers of purine bases. The methodology applied is versatile and should be extend-able to the preparation of a variety of other 1'-*homoisoazanucleoside*. The biological evaluations on antiviral and antitumor activities of the compounds synthesized are under way.

3- The compound **16** are applicable for the synthesis of new analogues of the neuroprotective agent GPE, as demonstrated by the preparation of the tripeptide **68**. The conversion of the methyl ester **16** to the acid **63** let coupled with glutamic dimethyl ester hydrochloride at gave the mixture of dipeptide diastereomers **64**, the subsequent coupling of **67**·CF₃CO₂H with Boc-glycine enabled the isolation of a mixture of diastereomers **68**, which proved impossible to resolve by column or thin layer chromatography.

4- A novel 3,5-disubstituted proline-based tripeptide mimetic scaffold has been designed, synthesized, and tested as a mimetic of PLG.

The acid **63** was coupled to L-leucine methyl ester hydrochloride using TBTU and DIPEA in CH₂Cl₂ give an excellent yield (96% of the mixture of diastereoisomers **66a** and **66b**), which were separated by flash column chromatography and the absolute configuration of dipeptide **66a** was

unequivocally determined by X-ray analysis. Hydrolysis of the methyl ester dipeptides **66a** and **66b**, followed by the coupling of the corresponding carboxylic acids **69a** and **69b** with glycine methyl ester hydrochloride, which gave the tripeptides esters **70a** and **70b**. The transformation of **70a** and **70b** into the corresponding primary amides **72a** and **72b** and finally, removal of the Boc protecting group by reaction with 4N HCl in dioxane, afforded the corresponding PLG analogs hydrochlorides with excellent yields.

5- The eleven PLG mimetics synthesized were found to have D₂ dopamine receptor modulating activities. All the studied compounds showed an increase of [³H]NPA union D₂ receptor at low concentrations, which is compatible with some allosteric modulation.

The best results were obtained for the compounds **82b** and **83b**, which showed gains of the union around 40% similar to those observed with PLG.



6. *ANEXOS*





Synthesis of methyl (\pm)-3,5-bis(substitutedmethyl)pyrrolidine-2-carboxylates: a convenient approach to proline-mimetics

Joana Ferreira da Costa^a, Olga Caamaño^{a,b,*}, Franco Fernández^{a,b}, Xerardo García-Mera^{a,b}, Pilar Midón^a, José Enrique Rodríguez-Borges^c

^a Departamento de Química Orgánica, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain

^b Instituto de Farmacia Industrial, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

^c CIQ- Departamento de Química, Facultade de Ciencias, Universidade de Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007, Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2010

Received in revised form 17 June 2010

Accepted 22 June 2010

Available online 25 June 2010

Keywords:

Synthesis

Pyrrolidine-2-carboxylates

Proline-mimetics

Peptides

ABSTRACT

Starting from readily available *N*-benzyl protected methyl 3,5-bis(hydroxymethyl)pyrrolidinecarboxylate a number of racemic methyl *t*-3,5-disubstitutedprolinates have been synthesised, thus opening a practical way towards the preparation of a variety of putative proline-mimetics. In this context, *N*-Boc protected derivatives proved to be better intermediates than their *N*-benzyl counterparts in terms of cleanness and overall yield of the synthetic procedure.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The key to understanding and modulating protein function as well as developing new therapies and diagnosis are Small Molecules.¹ In this context, the cyclic α -amino acids are synthetically interesting targets because they can be used as building blocks for the peptidomimetic structures synthesis with biological activity.² In recent years³ small heterocyclic molecules have attracted considerable attention and between these, proline-derived structures constitute a particularly interesting class of molecules.⁴

For our interest the most bioactive peptides have proline in their sequence, the important roles of the neuropeptides GPE (glycyl-L-prolyl-L-glutamate)⁵ and PLG (L-prolyl-L-leucyl-glycinamide)⁶ (Fig. 1) in the central nervous system have prompted exploration

of the possibility of using these species and/or their analogues to treat neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's chorea.

The GPE (Glypromate[®]) tripeptide is a peptide that naturally occurring and has been studied extensively. It was reported that GPE stimulates acetylcholine release from cortical slices of the rat^{7,8} and has considerable neuroprotective efficacy in multiple models. In vitro, Glypromate[®] has been shown to protect hippocampal neurons from glutamate-mediated excitotoxicity^{9,10} and protects cerebellar and striate cells from excitotoxicity and oxidative stress. These effects have been shown efficacy in various animal models of acute brain injury in juvenile and adult rats, hypoxia-ischemia,^{11–13} NMDA challenge,⁸ and in animal models of Parkinson's,^{14,15} the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis¹⁶ and β -amyloid-induced depletion of somastatin for relevance to Alzheimer's disease.¹⁷ This efficacy has been underpinned in the development of this drug as a neuroprotective agent and it is currently in Phase III clinical trials for the treatment of cognitive decline following on-pump cardiac surgery.¹⁸

The tripeptide PLG acts as a modulator of the dopamine receptor.⁶ Experiments have shown that PLG enhances the conversion of dopamine receptors from their low-affinity state to a high-affinity state for enhanced agonist binding.¹⁹ The precise mechanism of action behind PLG's ability to modulate the dopamine receptor is unclear. Preliminary evidence suggests the existence of a putative PLG binding site.^{20,21}

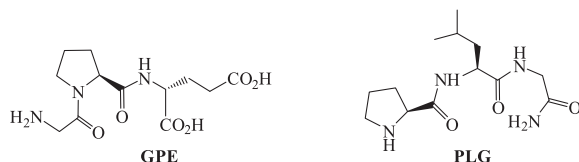


Figure 1.

* Corresponding author. Fax: +34981594912; e-mail address: molga.caamano@usc.es (O. Caamaño).

One subclass of PLG and GPE analogues is defined by replacement of the prolyl moiety by molecules that mimic proline and this is currently a very active area of investigation aimed at the development of new therapeutic agents.^{21–26}

From a structural point of view, the most commonly used proline-mimetics are derivatives of proline itself with a wide range of substituents. In terms of the substitution patterns on the proline ring, derivatives with 2-, 3-, 4- and 5-monosubstitution,^{24,26–29a,29b} 2,3,2,4- 3,4- and 3,5-disubstitution,^{24,27c,29–31} and some 2,3-, 4-, 2,4,5- and 3,4,5-trisubstitution^{24,27c,29a} patterns have been synthesised.

All these facts have contributed to the growing interest in finding short and efficient synthetic routes to substituted cyclic amino acids. This work describes here concerns 3,5-disubstituted proline derivatives and their potential as scaffolds in the synthesis of peptides with pharmacological activity. In this respect we have prepared 3,5-disubstituted proline analogues of type **I**. These derivatives have been obtained through synthetic routes associated with the synthesis of 2-azabicyclo[2.2.1]cyclohept-5-eno-3-carboxylic acid derivatives of type **II**, the synthesis of which has been pioneered by Stglich³² and was extended by other investigators,^{33–42} and subsequent synthetic exploitation of their stereoisomers^{39,40} has been developed by our group (Fig. 2).

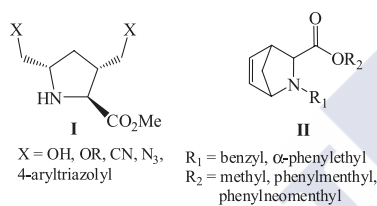


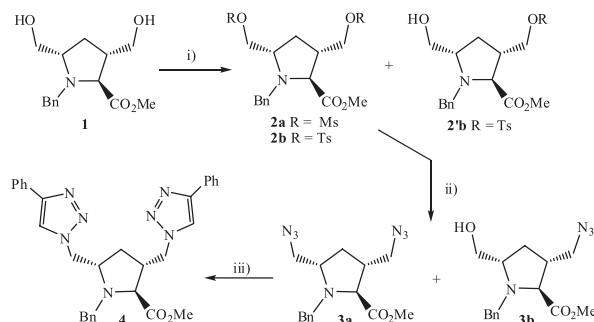
Figure 2.

2. Results and discussion

The synthesis of intermediate **1** (Scheme 1) was accomplished by an imino-Diels–Alder reaction⁴⁰ followed by a twofold hydroxylation and oxidative cleavage, as described previously.⁴¹ Treatment of **1** with excess mesyl chloride (3 equiv) using a standard procedure gave **2a** (64% yield). The use of tosyl chloride in a similar proportion gave worse results, with **2b** obtained in only 17% yield. With the aim of preparing mono(tosyloxy)derivatives another experiment was carried out with a smaller amount of tosyl chloride (1.6 equiv). In this case **2b** was isolated in 22% yield after column chromatography along with a monotosyl derivative of alcohol **1**, which was identified as **2'b** [the 3-(tosyloxy)derivative, yield 9%]. This compound was formed because the hydroxymethyl group in position 3 of the pyrrolidine ring of diol **1** is sterically less crowded. Furthermore, previous investigations carried out by our group support this result⁴² as attempts to selectively protect one of the hydroxy groups in **1** with *tert*-butyldiphenylsilyl chloride gave the derivative with the monosilyl ether on the hydroxymethyl group at position 3 as the major product.

Attempts to obtain diazide **3a** through nucleophilic substitution, by treatment with excess sodium azide, gave only poor-to-moderate yields (54%) of the desired product even when the most favourable reaction conditions were used (precursor **2a**). The use of **2b** as the starting material gave the 3-azidoderivative **3b** (Scheme 1). Subsequent Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition⁴³ between **3a** and phenylacetylene in the presence CuI⁴⁴ gave the ditriazole derivative **4** in 54% yield.

Efforts were made to improve the low yields obtained [mesylate **2a** (64%), tosylate **2b** (17%), diazide **3a** (54%) and ditriazole



Scheme 1. Reagents, conditions and yields: (i) (a) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, DMAP, rt, 1 h, **2a** (64%); (b) TsCl, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 4 h, **2b** (22%)+**2'b** (9%); (ii) NaN₃, DMF, 90 °C, 14 h, **3a** (41%)+**3b** (13%) from **2b**, and **3a** (54%) from **2a**; (iii) phenylacetylene, CuI, DIPEA, toluene, *t*-BuOH, 70 °C, 13 h, 54%.

derivative **4** (54%)] and minimise the difficult and laborious nature of the procedures described above, which can be attributed to the low reactivity of the functional groups on the methyl radicals in structures of type **I**. In this respect, it was decided to change the protecting group for the amino group of the proline, with *tert*-butoxycarbonyl (Boc) used instead of benzyl. The rationale for this change was that the presence of an electron-withdrawing group on the nitrogen of the pyrrolidine ring would increase the reactivity of the hydroxymethyl group, though other effects brought about by the introduction of a Boc group on the pyrrolidine ring such as changes of the geometry of the ring and in the orientation of the substituents at the 2 and 5 positions, due to both the minimisation of pseudoallylic 1,3-strain and to different intra-molecular H-bonding properties, may also be influential.

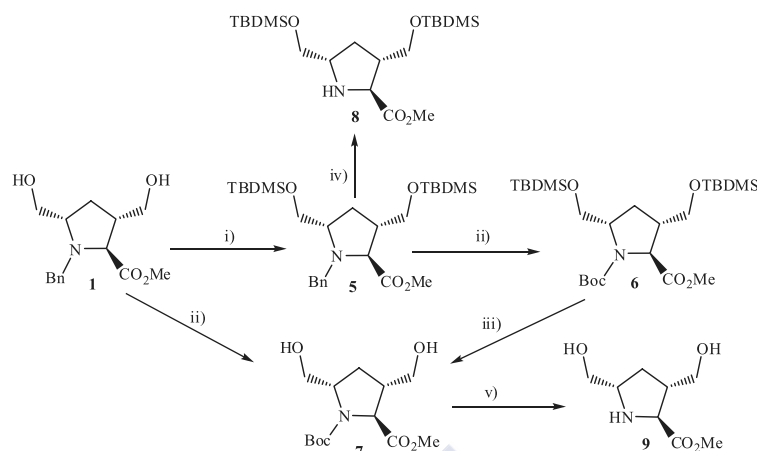
With this aim in mind, diol **7** was prepared by the route shown in Scheme 2. The hydroxy groups in diol **1** were first protected as silyl ethers by reaction with 3,5-bis(*tert*-butyltrimethylsilyl) chloride. The resulting disilyl ether **5** was hydrogenated in the presence of di-*tert*-butyl dicarbonate with Pd(OH)₂ as a catalyst. The resulting pyrrolidine derivative was reacted in situ to give the *N*-Boc derivative **6**⁴⁵ and subsequent cleavage of the silyl ethers in **6** with 1 M TBAF in THF gave **7** with an overall yield of 62%. Alternatively, a similar procedure carried out on compound **1** gave **7** directly in high yield (81%). Finally the treatment of **5** and **7** with trifluoroacetic acid gave proline-mimetics **8** and **9**, respectively.

The conversion of **7** to 3,5-bis(mesyloxymethyl)pyrrolidine derivative **10a** (Scheme 3) was practically quantitative on using a 1:3 ratio of **7**/mesyl chloride. However, the use of a lower ratio (1:2) also gave 3-(mesyloxymethyl)-5-(hydroxymethyl)pyrrolidine derivative **10b** (25%). Treatment of **10a** with NaN₃ under the same conditions used for the synthesis of **3a** led to diazide **11**, which underwent a 1,3-dipolar cycloaddition with ethynylbenzene, or (4-ethynylphenyl)methanol⁴⁶ to give, respectively **12a** or **12b** in good yields.

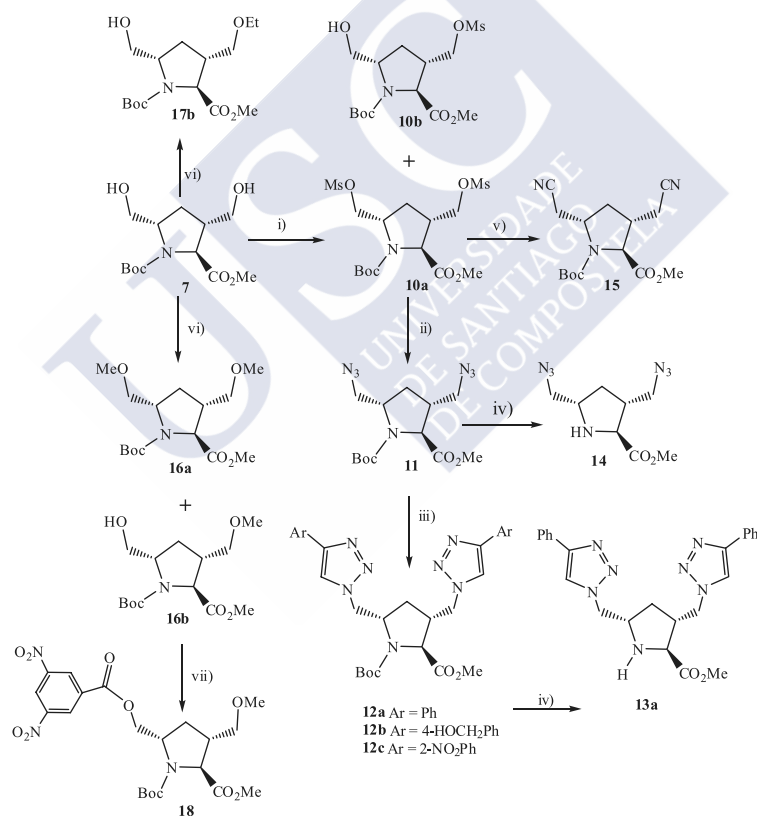
Finally, diazide **11** and 3,5-bis-[(4-aryltriazol)-1-ylmethyl]pyrrolidine derivatives **12a** were converted into the corresponding proline-mimetics **13a** and **14** by treatment with trifluoroacetic acid in dichloromethane at room temperature.

The reaction sequence (**1**→**7**→**10a**→**11**→**12a**), in which the pyrrolidine nitrogen of the substrates was protected as the *tert*-butylcarbamate, gave an overall yield of 51%, which compares favourably with the 19% yield obtained when the benzyl protecting group was used (**1**→**2a**→**3a**→**4**).

Other examples of utility of **7** or your (mesyloxymethyl)pyrrolidine derivative **10a** for the preparation of 3,5-disubstituted proline-mimetics was exemplified by the synthesis of the compounds **15–18**.



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) TBDMSO, imidazole, CH_2Cl_2 , rt, 2 h, 92%; (ii) 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 1 atm, Boc_2O , EtOAc, rt, 18 h, 6 (77%); 7 (81%); (iii) 1 M TBAF in THF, rt, 1 h, 7 (88%); (iv) 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 1 atm, EtOAc, rt, 144 h, 8 (42%); (v) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 4 h, 9 (76%).



Scheme 3. Reagents, conditions and yields: (i) (a) MsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , DMAP, rt, 1 h; ratio 7/ MsCl :1/3, **10a** (96%); ratio 7/ MsCl :1/2, **10a** (72%)+**10b** (25%); (ii) NaN_3 , DMF, 90 °C, 2 h, 76%; (iii) arylacetylene, CuI, DIPEA, toluene, *t*-BuOH, rt, 24 h, **12a** (87%), **12b** (60%), **12c** (–); (iv) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, CH_2Cl_2 , rt 3 h, **13a** (98%); (v) NaCN, 18-crown-6, CH_3CN , 60 °C, 23 h, 61%; (vi) RI, Ag_2O , CH_3CN , 40 °C, 60 h, **16a** (36%)+**16b** (34%); **17b** (37%); (vii) 3,5-dinitrobenzyl chloride, THF, rt, 45 h, 46%.

Reaction of **10a** with NaCN in acetonitrile and 18-crown-6 at 60 °C⁴⁶ gave dicyanide **15**. The structure of **15** was unequivocally determined by means of X-ray analysis of a single crystal (Fig. 3).⁴⁷ This confirmed the relative configuration of the **10a** intermediate key, and consequently that, of the complete series of derivatives of the same.

The preparation of **16a** proved problematical by the reaction of mesylate **10a** and MeOH in the presence of KOH, but the desired

compound was finally obtained in 46% yield along with monoether **16b** (38%) by reaction of **7**, MeI and Ag_2O in acetonitrile⁴⁸ (Scheme 3). The product ratio of **16a/16b** was 46:38 and this remained unchanged even on using a large excess of methylating agent (molar ratio **10a/CH₃I** of 1:140) and prolonged reaction times (up to 120 h). The treatment of **7** with EtI in similar conditions, leads mainly to monoether **17b**.

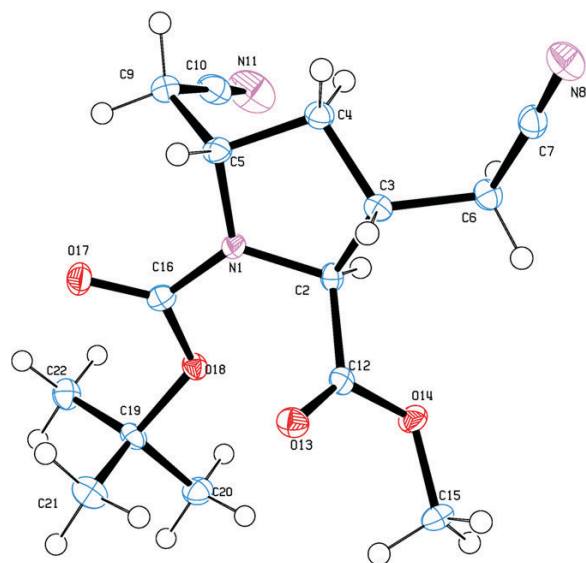


Figure 3. X-ray crystallographic structure of **15**.

3. Conclusion

The procedure here described is a contribution to the enlargement of the pool of available proline-like structures—a currently very active field with the aim of obtaining new proline-mimetic therapeutic agents. While exploring synthetic approaches to 3,5-disubstituted prolines from a readily available *N*-benzyl protected derivative, **1**, we found that *N*-Boc derivatives are better intermediates than *N*-benzyl derivatives in terms of cleanliness and overall yield of the synthetic procedure, as it can be seen comparing reaction sequence (**1** → **7** → **10a** → **11** → **12**) with (**1** → **2a** → **3a** → **4**). In addition, a variety of functional group modifications of the hydroxymethyl groups of **7** have been carried out, thus enabling the preparation of compounds **9**, **13**–**18** and showing diol **7** as a versatile synthon for the preparation of a variety of 3,5-disubstituted proline-mimetics.

4. Experimental

4.1. General methods

All chemicals were of reagent grade and were obtained from Aldrich Chemical Co. and used without further purification. All air-sensitive reactions were carried out under argon. Flash chromatography was performed on silica gel (Merck 60, 230–240 mesh) and analytical TLC was carried out on pre-coated silica gel plates (Merck 60 F₂₅₄, 0.25 mm). Melting points were measured on a Reichert Kofler Thermopan apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were recorded on a Perkin–Elmer 1640 FTIR spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AMX 300 spectrometer at 300 and 75.47 MHz, respectively, using TMS as an internal standard (chemical shifts in δ values, *J* in hertz). Mass spectra were recorded on Hewlett–Packard HP5988A or Micromass Autospec spectrometers. Microanalyses were performed on a FISON EA 1108 Elemental Analyser at the University of Santiago Microanalysis Service; all results shown are within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values.

4.1.1. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-1-benzyl-3,5-[[bis(methylsulfonyl)oxy]methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (**2a**).** MsCl chloride (250 μ L, 3.22 mmol) was added dropwise over 5 min to a cooled (0 °C),

stirred solution of **1** (0.30 g, 1.07 mmol), dry Et₃N (225 μ L) and a catalytic amount of 4-DMAP in dry CH₂Cl₂ (10 mL) under argon. On completion of the addition the mixture was stirred at room temperature until the starting material had been consumed (TLC, about 1 h). The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (70 mL) and the organic layer was washed successively with saturated aqueous NaHCO₃ (2 \times 20 mL), H₂O (2 \times 20 mL) and saturated aqueous NaCl (20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting oil (0.43 g) was purified by column chromatography on silica gel (11 g) (eluent, hexane/EtOAc 1:1). The fractions containing the dimesylated derivative **2a** were concentrated to dryness to give a yellow oil (0.3 g, 64%). IR (film) ν : 3346, 2954, 1726 (CO), 1655, 1459, 1170 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.63–1.69 (m, 1H, 4-HH), 2.41–2.57 (m, 2H, 3-H+4-HH), 2.93 (s, 3H, SO₂CH₃), 2.95 (s, 3H, SO₂CH₃), 3.53–3.56 (m, 1H), 3.64–3.75 (m, 2H), 3.68 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.74 and 4.0 (part A ABM system, *J* = 13.6 Hz, 2H, PhCH₂), 4.07–4.31 (m, 4H, 2OCH₂), 7.21–7.32 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 29.26 (CH₂), 37.57 (CH₃), 37.86 (CH₃), 40.64 (CH), 51.96 (CO₂CH₃), 52.98 (CH₂), 60.10 (CH), 65.56 (CH), 69.79 (CH₂), 71.25 (CH₂), 127.86 (CH), 127.98 (CH), 128.81 (CH), 128.92 (CH), 129.40 (CH), 138.88 (C), 173.23 (CO₂CH₃). MS (ESI-TOF, %): 358.14 (M–Ph, 100). HRMS *m/z* calcd for C₁₇H₂₅NO₈S₂, 435.1022; found, 435.1039.

4.1.2. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-1-benzyl-3,5-bis[[p-tolylsulfonyl]oxy]methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (**2b**) and methyl (2*R**,3*R**,5*R**)-1-benzyl-5-(hydroxymethyl)-3-[[p-tolylsulfonyl]oxy]methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (**2'b**).** TsCl (1.35 g, 7.10 mmol) was added to a cooled (ice bath) solution of **1** (1.24 g, 4.44 mmol) in dry CH₂Cl₂ (6 mL) and dry pyridine (1.2 mL). The mixture was stirred at room temperature under argon for 4 h and was then diluted with CH₂Cl₂ (40 mL). The organic solution was washed with saturated aqueous NaHCO₃ (2 \times 20 mL), saturated aqueous NH₄Cl (2 \times 20 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting brown oil (1.85 g) was purified by column chromatography on silica gel (60 g) (eluent, hexane/EtOAc 1:3). Compound **2b** (0.56 g, 22%) was eluted first and the mono-tosylated compound **2'b** (0.17 g, 9%) was eluted second as a brownish oil after removal of the solvent.

Compound 2b. Brownish oil. IR (film) ν : 3141, 2953, 1734 (CO), 1598, 1454, 1360, 1315, 1178, 1113, 1096, 964, 819, 667, 556 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.39–1.45 (m, 1H, 4-HH), 2.28–2.42 (m, 2H, 2-H+4-HH), 2.44 (s, 3H, C₆H₄CH₃), 2.46 (s, 3H, C₆H₄CH₃), 3.44–3.47 (m, 1H), 3.49–3.53 (m, 1H), 3.58–3.65 (m, 1H), 3.61 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.66–3.69 (m, 1H), 3.77–3.90 (m, 3H), 4.03–4.09 (m, 1H), 7.05–7.08 (m, 2H), 7.22–7.25 (m, 3H), 7.30–7.37 (m, 4H), 7.70–7.79 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 22.06 (CH₃), 22.09 (CH₃), 29.71 (CH₂), 40.71 (CH), 51.83 (CO₂CH₃), 52.01 (CH₂), 59.83 (CH), 65.69 (CH), 70.90 (CH₂), 71.89 (CH₂), 127.73 (CH), 128.25 (CH), 128.54 (CH), 128.77 (CH), 130.34 (CH), 133.03 (C), 133.06 (C), 138.73 (C), 138.76 (C), 145.26 (C), 173.13 (CO₂CH₃). HRMS *m/z* calcd for C₂₉H₃₃NO₈S₂, 587.1648; found, 587.1665.

Compound 2'b. Brownish oil. IR (film) ν : 3418, 2955, 2860, 1741, 1456, 1173, 1119, 679 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.52 (ddd, *J* = 13.3, 5.8, 3.1 Hz, 1H, 4-HH), 2.21 (br s, 1H, D₂O exchange, OH), 2.26 (dd, *J* = 9.2, 4.2 Hz, 1H, 4-HH), 2.32–2.43 (m, 1H), 2.40 (s, 3H, C₆H₄CH₃), 3.33–3.41 (m, 2H), 3.52 (dd, *J* = 11.3, 3.3 Hz, 1H), 3.56–3.63 (m, 1H), 3.61 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.66 and 3.85 (part A ABM system, *J* = 13.9 Hz, 2H, CH₂C₆H₅), 3.92 (dd, *J* = 9.6, 6.0 Hz, 1H), 3.99–4.05 (m, 1H), 7.14–7.17 (m, 2H), 7.19–7.30 (m, 5H), 7.70–7.73 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 22.02 (CH₃), 29.58 (CH₂), 40.43 (CH), 51.78 (CO₂CH₃), 52.84 (CH₂), 61.83 (CH₂), 62.83 (CH), 66.24 (CH), 72.16 (CH₂), 127.73 (CH), 128.26 (CH), 128.53 (CH), 128.96 (CH), 130.30 (CH), 133.27 (C), 139.19 (C), 145.29 (C), 173.42 (CO₂CH₃). MS (FAB *m/z*): 434.25 (M+1, 100). HRMS *m/z* calcd for C₂₂H₂₇NO₆S, 433.1559; found, 433.1578.

4.1.3. Methyl (2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidomethyl)-1-benzylpyrrolidine-2-carboxylate (**3a**) and methyl (2*R**,3*S**,5*R**)-3-(azidomethyl)-1-benzyl-5-(hydroxymethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**3b**).** Method A. NaN₃ (0.22 g, 3.40 mmol) was added to a stirred solution of **2b** (0.2 g, 0.34 mmol) in dry DMF (11 mL) under argon at room temperature. The reaction mixture was heated at 90 °C for 14 h. The DMF was removed under reduced pressure and the residue was partitioned between H₂O (100 mL) and Et₂O (50 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3×25 mL) and the combined organic phases were washed with saturated aqueous NaCl (25 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give an oily residue (0.11 g), which was purified by column chromatography on silica gel (25 g) (hexane/EtOAc 6:1). Compound **3a** (0.06 g, 54%) was isolated as a colourless solid after removal of the solvent, mp 75–78 °C. IR (KBr) ν : 3.444, 2947, 2874, 2097, 1733, 1436, 1255, 1164, 1131 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.55–1.62 (m, 1H, 4-HH), 2.28–2.44 (m, 2H, 2-H+4-HH), 3.24 and 3.40 (ABM system, J =2.8, 3.2, 12.8 Hz, 2H, PhCH₂), 3.35–3.41 (m, 1H), 3.43–3.51 (m, 2H), 3.53–3.59 (m, 1H), 3.66 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.73 (d, J =13.6 Hz, 1H), 4.0 (d, J =13.6 Hz, 1H), 7.25–7.35 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 31.59 (CH₂), 41.28 (CH), 51.79 (CO₂CH₃), 52.87 (CH₂), 53.66 (CH₂), 55.53 (CH₂), 61.30 (CH), 66.50 (CH), 127.75 (CH), 128.69 (CH), 128.91 (CH), 138.94 (C), 173.70 (CO₂CH₃). MS (ESI-TOF m/z %): 330.17 (M+1, 100). Anal. Calcd for C₁₅H₁₉N₇O₂ (329.36): C 54.70, H 5.81, N 29.77; found C 55.01, H 5.72, N 29.95.

Method B. A method similar to that described above was used but dimesylated derivative **2a** (1.13 g, 2.59 mmol) was used as the starting material. The standard procedure and subsequent chromatographic separation of the crude product (eluent hexane/EtOAc 8:1) gave compound **3a** (0.35 g, 41%) as the first eluted product. The physical and spectroscopic data for this compound are identical to those for the compound obtained using method A. Removal of the solvent from the second eluted compound gave **3b** as a yellowish oil (0.1 g, 13%). IR (film) ν : 3.419, 2929, 2100, 1733, 1452, 1205 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.64–1.69 (m, 1H, 4-HH), 2.11 (br s, 1H, D₂O exchange, OH), 2.30–2.41 (m, 2H, 2-H+4-HH), 3.35–3.38 (m, 2H), 3.42–3.46 (m, 1H), 3.50–3.55 (m, 1H), 3.56–3.59 (m, 1H), 3.66 (d, J =3.1 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.72 and 3.92 (AB system, J =13.7 Hz, 2H), 7.23–7.36 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 30.91 (CH₂), 41.05 (CH), 51.84 (CO₂CH₃), 52.63 (CH₂), 55.57 (CH₂), 61.37 (CH₂), 63.05 (CH), 66.97 (CH), 127.85 (CH), 128.59 (CH), 129.08 (CH), 138.19 (C), 174.06 (CO₂CH₃). MS (ESI-TOF m/z %): 305.16 (M+1, 100). HRMS m/z calcd for C₁₅H₂₀N₄O₃, 304.1535; found, 304.1552.

4.1.4. Methyl (2*R,3*S**,5*R**)-1-benzyl-3,5-bis((4-phenyltriazol)-1-ylmethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**4**).** Phenylacetylene (0.25 g, 2.44 mmol), CuI (0.09 g, 0.043 mmol) and DIPEA (0.26 g, 2.04 mmol) were added to a solution of **3a** (0.31 g, 1.02 mmol) in toluene (4.2 mL) and *tert*-butanol (1.2 mL) under argon at room temperature. The reaction mixture was stirred for 18 h at 70 °C. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc (50 mL). The solution was washed with H₂O (2×25 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give **4** (0.29 g, 54%) as a colourless solid, mp 140–142 °C. IR (KBr) ν : 3125, 1730, 1484, 1436, 1364, 1226, 1204, 1150, 1073, 765, 735, 710 cm⁻¹. ¹H NMR (acetone-*d*₆) δ : 1.84 (ddd, J =7.1, 5.1, 4.7 Hz, 4-HH), 2.40 (dt J =13.9, 9.2 Hz, 4-HH), 2.79–2.82 (m, 1H), 3.57 (s, 3H, CH₃), 3.81 (d, J =13.8 Hz, 1H), 3.94 (dd, J =10.1, 4.7 Hz, 1H), 4.13–4.31 (m, 3H), 4.64–4.78 (m, 2H), 7.24–7.37 (m, 5H), 7.39–7.46 (m, 6H), 7.80–7.78 (m, 2H), 7.88–7.92 (m, 2H), 8.15 and 8.38 (2s, 2H, 5-H pyrazole+5'-H pyrazole). ¹³C NMR (acetone-*d*₆) δ : 30.36 (CH), 41.55 (CH₂), 50.69 (CH₂), 52.13 (CH), 52.21 (CH), 52.88 (CH), 61.13 (CH₂), 65.62 (CH₂), 120.81 (CH), 120.87 (CH), 121.94 (CH), 125.30 (CH), 125.38 (CH), 127.18 (CH), 127.72 (CH), 127.76 (CH), 128.41 (CH), 128.47 (CH), 128.72 (CH), 128.78 (CH), 131.24 (C), 131.31 (C), 138.95 (C), 146.87 (C), 146.92 (C), 172.30 (CO₂CH₃). MS (EI m/z

%): 534 (3), 533 (M, 7), 443 (20), 442 (69), 376 (11), 375 (44), 329 (15), 297 (13), 256 (13), 230 (9), 184 (8), 172 (15), 130 (11), 103 (10), 102 (8), 82 (9), 91 (100). Anal. Calcd for C₃₁H₃₁N₇O₂ (553.62): C 69.77, H 5.86, N 18.37; found C 69.97, H 6.03, N 18.59.

4.1.5. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-1-benzyl-3,5-bis(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**5**).** A mixture of **1** (2.45 g, 8.77 mmol), imidazole (2.63 g, 38.59 mmol) and TBDMSCl (4.23 g, 28.06 mmol) in dry CH₂Cl₂ (185 mL) was stirred under argon at room temperature for 2 h. The mixture was partitioned between CH₂Cl₂ (300 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (400 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3×100 mL) and the combined organic extracts were washed with saturated aqueous NH₄Cl (3×125 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give an oily residue (4.20 g), which was purified by column chromatography on silica gel (120 g) (eluent, hexane/EtOAc 10:1). The disilyl ether **5** was eluted first and was isolated as a colourless oil (3.55 g, 92%). IR (film) ν : 2932, 2858, 1736, 1463, 1361, 1255, 1101, 840 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : -0.02 (s, 3H, CH₃), 0.0 (s, 3H, CH₃), 0.2 (s, 3H, CH₃), 0.3 (s, 3H, CH₃), 0.84 (s, 9H, (CH₃)₃), 0.88 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.38–1.43 (m, 1H, 4-HH), 2.20–2.26 (m, 2H, 2-H+4-HH), 3.41–3.51 (m, 3H), 3.56–3.60 (m, 3H), 3.63 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.71 and 4.07 (AB system, J =14.2 Hz, 2H), 7.20–7.28 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : -5.0 (2 CH₃), -4.9 (2 CH₃), 20.91 (C), 26.24 [(CH₃)₃], 26.32 [(CH₃)₃], 30.21 (CH₂), 44.66 (CH), 51.38 (CO₂CH₃), 53.40 (CH₂), 63.07 (CH), 66.11 (CH₂), 66.40 (CH), 66.57 (CH₂), 127.07 (CH), 128.49 (CH), 129.68 (CH), 140.36 (C), 175.56 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 448 (M-CO₂CH₃, 1), 363 (23), 362 (82), 91 (100), 89 (21), 73 (39). HRMS m/z calcd for C₂₇H₄₉NO₄Si₂, 507.3200; found, 507.3216.

4.1.6. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3,5-bis(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**6**).** A solution of **5** (3.95 g, 7.78 mmol) in dry EtOAc (100 mL) was added to a suspension of 20% Pd(OH)₂/C (0.55 g, 3.89 mmol) and Boc₂O (2.21 g, 10.11 mmol) in dry EtOAc (40 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature under a positive pressure of hydrogen for 18 h. The catalyst was filtered off and washed with EtOAc. The filtrate was washed with aqueous NaCl (5×25 mL). The organic extract was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure to give an oily residue (4.20 g), which was purified by column chromatography on silica gel (100 g) (eluent, hexane/EtOAc 10:1). Compound **6** (3.10 g, 77%) was isolated as a colourless oil. IR (film) ν : 3356, 2953, 2860, 1750, 1707, 1467, 1370, 1254, 1177, 1100, 840 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.04 (s, 6H, 2 CH₃), 0.05 (s, 6H, 2 CH₃), 0.87 (s, 6H, 2 CH₃), 0.88 (s, 6H, 2 CH₃), 0.89 (s, 6H, 2 CH₃), 1.38 (s, 6H, 2 CH₃), 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.83–1.93 (m, 1H, 4-HH), 2.11–2.19 (m, 1H), 2.29–2.33 (m, 1H), 3.54–3.59 (m, 1H), 3.63–3.67 (m, 1H), 3.71 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.80–3.82 (m, 2H), 4.0–4.02 (m, 1H), 4.06 (d, 1H, J =4.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : -4.97 (2 CH₃), -4.91 (CH₃), -4.87 (CH₃), 18.65 (2C), 26.23 (3CH₃), 26.31 (3CH₃), 28.63 (3CH₃), 28.83 (CH), 29.37 (CH₂), 45.62 (CH), 52.22 (CO₂CH₃), 60.0 (CH), 63.52 (CH₂), 64.97 (CH₂), 80.27 (C), 154.91 (C), 174.93 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 444 (M-O-*t*-Bu, 2), 405 (11), 404 (37), 360 (31), 300 (25), 273 (20), 272 (100), 168 (16), 140 (23), 73 (60). HRMS m/z calcd for C₂₅H₅₁NO₆Si₂, 517.8465; found, 517.8482.

4.1.7. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3,5-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**7**).** Method A: A 1 M solution of TBAF in THF (12.11 mL, 12.11 mmol) was added to a cooled (ice bath) solution of **6** (2.85 g, 5.50 mmol) in dry THF (30 mL) under argon. The cooling bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting oily residue (5.2 g) was purified by column chromatography on silica gel (160 g) (eluent, CH₂Cl₂/MeOH 30:1). Compound **7** was eluted first and, after removal of the

solvent, was isolated as an oil that crystallised slowly (1.40 g, 88%), mp 88–92 °C. IR (KBr) ν : 3409, 2981, 1742, 1667, 1384, 1320, 1204, 1180, 1141, 1081, 1037, 785 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.46 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.48–1.53 (m, 1H, 4-HH), 1.82 (br s, 2H, D₂O exchange, 2OH), 2.15–2.25 (m, 1H, 4-HH), 2.29–2.40 (m, 1H, 3-H), 3.61–3.70 (m, 4H, 2 \times OCH₂), 3.74 (s, 3H, CH₃), 4.04–4.13 (m, 1H, 5-H), 4.19 (d, J =5.4 Hz, 1H, 2-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 28.15 [(CH₃)₃], 30.57 (CH₂), 43.96 (CH), 52.17 (CH₃), 61.97 (CH), 63.86 (CH₂), 63.92 (CH), 66.68 (CH₂), 81.85 (C), 156.42 (NCO₂), 173.84 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 258 (M–OCH₃, 7), 159 (8), 158 (100), 142 (8), 130 (17), 100 (9), 98 (11), 68 (17), 57 (42). HRMS m/z calcd for C₁₃H₂₃NO₆, 289.1525; found, 289.1534.

Method B. A solution of **1** (9.01 g, 32.26 mmol) in EtOAc (250 mL) was added to a suspension of 20% Pd(OH)₂/C (2.26 g, 16.13 mmol) and Boc₂O (9.15 g, 41.94 mmol) in dry EtOAc (30 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature under a positive pressure of hydrogen for 114 h. The catalyst was filtered off and washed with EtOAc. The solvent was removed under reduced pressure to give an oily residue (10.5 g), which was purified by column chromatography on silica gel (240 g) (hexane/EtOAc 1:3). Compound **7** (7.84 g, 84%) was isolated as a colourless solid. The physical and spectroscopic data for **7** were identical to those for the product obtained using method A.

4.1.8. Methyl (2R*,3R*,5R*)-3,5-bis[[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (8). A solution of **5** (150 mg, 0.296 mmol) in dry EtOAc (3 mL) was added to a suspension of 20% Pd(OH)₂/C (21 mg, 0.15 mmol) in dry EtOAc (3 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature under a hydrogen atmosphere for 7 days. The catalyst was filtered off (Celite) and washed with EtOAc. The solvent was removed under reduced pressure to give an oily residue (125 mg), which was purified by column chromatography on silica gel (eluent, hexane/EtOAc 10:1). Compound **8** (52 mg, 42%) was isolated as a yellow oil. IR (film) ν : 2932, 2859, 1739, 1465, 1387, 1254, 1207, 1097, 777 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.05 (s, 12H, 4CH₃), 0.89 [s, 18H, 2C(CH₃)₃], 1.25–1.37 (m, 3H, one of them D₂O exchange, 4-H₂ and NH), 1.91–2.04 (m, 1H), 2.39–2.47 (m, 1H), 3.39–3.42 (m, 1H), 3.50–3.69 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : –2.37 (2 CH₃), –5.9 (2 CH₃), 22.79 (C), 25.42 [(CH₃)₃], 25.76 [(CH₃)₃], 30.21 (CH₂), 43.09 (CH), 51.65 (CO₂CH₃), 62.08 (CH), 66.51 (CH₂), 66.40 (CH), 67.57 (CH₂), 176.89 (CO₂CH₃). HRMS m/z calcd for C₂₀H₄₃NO₄Si₂, 417.2737; found, 417.2744.

4.1.9. Methyl (2R*,3R*,5R*)-1-(tert-butoxycarbonyl)-3,5-bis[[(methylsulfonyl)oxy]methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (10a). Compound **10a** was prepared using the procedure described for **2a** but with diol **7** (0.40 g, 1.38 mmol) as the starting material. The standard work-up procedure and separation by column chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 1:3) gave **10a** as a yellowish oil (0.59 g, 96%). IR (film) ν : 2977, 1746, 1699, 1355, 1174, 961, 829, 747 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.40 [s, 6H, C(CH₃)₂], 1.48 [s, 3H, C(CH₃)], 1.89 (dt, 1H, J =13.8, 4.6 Hz, 4-HH), 2.43 (dt, 1H, J =13.8, 8.9 Hz, 4-HH), 2.62–2.67 (m, 1H, 3-H), 3.02 (s, 3H, SO₂CH₃), 3.07 (s, 3H, SO₂CH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.19–4.38 (m, 5H, 2OCH₂+5-H), 4.70 (dd, J =10.1, 4.6 Hz, 1H, 2-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 28.51 [(CH₃)₃], 28.91 (CH₂), 37.44 (SO₂CH₃), 37.85 (SO₂CH₃), 41.77 (CH), 52.83 (CO₂CH₃), 57.25 (CH), 63.45 (CH), 69.70 (CH₂), 70.04 (CH₂), 83.45 (C), 154.02 (NCO₂), 172.50 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 389 ((M+1)–*t*-Bu, 1), 344 (M–Boc, 4), 286 ((M+1)–(Boc+CO₂CH₃), 63), 236 (79), 234 (19), 190 (74), 140 (15), 138 (23), 91 (100), 80 (34), 79 (72), 68 (15), 67 (31), 59 (23), 58 (95), 57 (99). HRMS m/z calcd for C₁₅H₂₇NO₁₀S₂, 445.1076; found, 445.1088.

4.1.10. Methyl (2R*,3R*,5R*)-1-(tert-butoxycarbonyl)-5-(hydroxymethyl)-3-[[[(methylsulfonyl)oxy]methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (10b). When a **7**/MsCl molar ratio of 1:2 was used compound **10b**

was obtained as a minor product. The standard work-up procedure and separation by column chromatography (silica gel, hexane/EtOAc 1:3) gave **8a** in 72% yield (spectroscopic data were identical to those described previously) from the first fractions and **10b** in 25% yield from later fractions.

Compound 10b. Colourless oil. IR (film) ν : 3433, 2976, 1744, 1691, 1361, 1174, 1087, 1048, 960, 839 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.48–1.60 (m, 2H, one of them D₂O exchange, 4-HH+OH), 2.28 (dt, 1H, J =13.2, 7.6 Hz, 4-HH), 2.56–2.59 (m, 1H), 3.07 (s, 3H, SO₂CH₃), 3.61–3.68 (m, 1H), 3.76 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.09–4.15 (m, 2H), 4.25 (ddd, J =21.2, 10.2, 6.6 Hz, 2H), 5.38 (m, 1H, 2-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 28.54 [(CH₃)₃], 30.83 (CH₂), 37.96 (SO₂CH₃), 41.79 (CH), 52.77 (CO₂CH₃), 62.18 (CH), 63.73 (CH), 66.53 (CH₂), 69.59 (CH₂), 82.13 (C), 156.09 (C), 173.22 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 336 (M–OCH₃, 5), 237 (9), 236 (88), 208 (10), 140 (19), 126 (17), 112 (29), 91 (14), 82 (13), 80 (37), 79 (15), 68 (15), 57 (100). HRMS m/z calcd for C₁₄H₂₅NO₈S, 367.4152; found, 367.4166.

4.1.11. Methyl (2R*,3S*,5R*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(tert-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylate (11). NaN₃ (0.95 g, 14.6 mmol) was added to a stirred solution of **10a** (0.65 g, 1.46 mmol) in dry DMF (55 mL) under argon at room temperature and the mixture was heated at 90 °C for 1 h. The DMF was removed under reduced pressure and the residue was partitioned between H₂O (100 mL) and Et₂O (50 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 \times 25 mL) and the combined organic phases were washed with saturated aqueous NaCl (2 \times 25 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give an oily residue (0.39 g), which was purified by column chromatography on silica gel (15 g) (eluent, hexane/EtOAc 3:1). Compound **11** (0.35 g, 71%) was obtained as a yellow solid, mp 45–48 °C. IR (KBr) ν : 2977, 2103, 1748, 1703, 1448, 1366, 1262, 1204, 1174, 1138 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.40 [s, 6H, C(CH₃)₂], 1.49 [s, 3H, C(CH₃)], 1.72–1.79 (m, 1H, 4-HH), 2.24–2.31 (m, 1H), 2.35–2.42 (m, 1H), 3.43–3.56 (m, 4H), 3.76 (s, 3H, CH₃), 3.98 (dd, J =12.4, 5.5 Hz, 1H), 4.08–4.12 (m, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 28.56 [(CH₃)₃], 31.42 (CH₂), 42.20 (CH), 52.69 (CH₂), 52.79 (CH₃), 53.92 (CH₂), 58.0 (CH), 64.38 (CH), 82.35 (C), 155.21 (NCO₂), 173.50 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 283 [(M+1)–*t*-Bu, 8], 183 (68), 126 (12), 80 (12), 68 (21), 59 (11), 57 (100). Anal. Calcd for C₁₃H₂₁N₇O₄ (339.3503): C 46.01, H 6.24, N 28.89; found C 46.33, H 6.19, N 29.07.

4.2. General procedure for the synthesis of the bitriazolyl derivatives 12 through a copper(I)-catalyzed Huisgen reaction

Aryl alkyne (200 mg, 2.05 mmol), CuI (0.043 mmol) and DIPEA (1.75 mmol) were added to the diazide **11** (0.85 mmol) solution in toluene (3.5 mL) and *tert*-butanol (1 mL) under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature or reflux for 15–72 h. The solvents were removed under reduced pressure to afford a solid residue, which was purified by recrystallization or on column chromatography on silica gel.

4.2.1. Methyl (2R*,3S*,5R*)-1-(tert-butoxycarbonyl)-3,5-bis-[(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (12a). Aryl alkyne: ethynylbenzene, room temperature 15 h, white solid, yield 87%, mp 238–242 °C (recrystallized from EtOAc). IR (KBr) ν : 3084, 2978, 1746, 1711, 1354, 1305, 1202, 1177, 767, 696 cm^{-1} . ^1H NMR (TFA-*d*₁) δ : 1.48 [s, 9H, C(CH₃)₃], 2.34–2.44 (m, 1H, 4-HH), 2.80–2.90 (m, 1H, 4-HH), 3.79 (s, 3H, CH₃), 4.78–4.87 (m, 2H), 5.04–5.36 (m, 5H), 7.46–7.67 (m, 10H, 2phenyl), 8.64 (s, 2H, 5-H pyrazole+5'H pyrazole). ^{13}C NMR (TFA-*d*₁) δ : 25.66 [(CH₃)₃], 32.90 (CH₂), 40.90 (CH), 52.29 (CH₂), 54.03 (CH₂), 54.44 (CH₃), 59.70 (CH), 62.07 (CH), 90.10 (C), 120.17 (C), 120.04 (C), 125.41 (CH), 125.66 (CH), 126.12 (CH), 129.60 (CH), 132.72 (CH), 144.64 (C), 144.98 (C), 160.15 (NCO₂), 167.52 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 544 (M+1, 100), 516

(25), 489 (29), 488 (81), 444 (31), 416 (14), 299 (21), 186 (16), 174 (46), 160 (15), 146 (15), 132 (24), 130 (17), 120 (19), 119 (15), 118 (68), 105 (23), 104 (63), 103 (46), 93 (20), 91 (40). Anal. Calcd for $C_{29}H_{33}N_7O_4$ (543.62): C 64.07, H 11.6, N 18.04; found C 64.31, H 11.54, N, 18.26.

4.2.2. Methyl (2*R,3*S**,5*R**)-1-(tert-butoxycarbonyl)-3,5-bis-[[4-(4-hydroxymethyl)phenyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylmethyl]pyrrolidine-2-carboxylate (**12b**).** Aryl alkyne: (4-ethynylphenyl)methanol, reflux 17 h, white solid, yield 60%, mp 227–229 °C (recrystallized from EtOAc/EtOH). IR (KBr) ν : 3327, 2941, 1744, 1704, 1401, 1350, 1176, 1141, 1044, 1009, 978, 802 cm^{-1} . 1H NMR (TFA- d_1) δ : 1.73 [s, 9H, C(CH₃)₃], 2.65–2.69 (m, 1H, 4-*HH*), 3.09–3.11 (m, 1H, 4-*HH*), 3.76–3.88 (m, 1H), 4.07 (s, 3H, CH₃), 4.99–5.10 (m, 3H), 5.29–5.35 (m, 2H), 5.42–5.49 (m, 2H), 5.52–5.66 (m, 3H), 7.75–7.83 (m, 4H, 2-H+6-H phenyl+2'-H+6'-H phenyl), 7.86–7.98 (m, 4H, 3-H+5-H phenyl+3'-H+5'-H phenyl), 8.93 and 8.95 (2s, 2H, 5-H pyrazole+5'-H pyrazole). ^{13}C NMR (TFA- d_1) δ : 25.34 (CH₂), 25.61 [CH₃C(CH₃)₂], 25.87 [2 CH₃C(CH₃)₂], 33.17 (CH₂), 41.11 (CH), 52.55 (CH₂), 54.32 (CH₃), 54.69 (CH₂), 59.89 (CH), 62.28 (CH), 63.97 (CH₂), 68.51 (C), 108.73 (CH), 112.47 (CH), 119.99 (CH), 121.49 (CH), 126.94 (CH), 127.13 (CH), 128.52 (CH), 128.58 (CH), 129.41 (CH), 129.48 (CH), 138.47 (2C), 144.84 (C), 144.25 (C), 160.15 (NCO₂), 167.73 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 604 (M+1, 100), 604 (52), 309 (18), 278 (18), 263 (14), 231 (72), 197 (12), 156 (10), 155 (34), 154 (98), 139 (14), 137 (100), 19 (24), 105 (12). Anal. Calcd for $C_{31}H_{37}N_7O_6$ (603.67): C 61.68, H 6.18, N 16.24; found C 61.97, H 6.31, N, 16.53.

4.2.3. Methyl (2*R,3*S**,5*R**)-1-(tert-butoxycarbonyl)-3,5-bis-[[4-(2-nitromethyl)phenyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylmethyl]pyrrolidine-2-carboxylate (**12c**).** Aryl alkyne: 1-ethynyl-2-nitrobenzene, reflux 17 h, yellow-white solid, yield 57%, mp 118–119 °C (purified by column chromatography on silica gel, eluent hexane/EtOAc 1/1). IR (KBr) ν : 3108, 1736, 1700, 1528, 1348, 1217, 1176, 1143, 854, 751 cm^{-1} . 1H NMR (CDCl₃) δ : 1.46 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.91 (dt, $J=14.0$, 5.5 Hz, 1H, 4-*HH*), 2.42 (dt, $J=14.1$, 9.0 Hz, 1H, 4-*HH*), 2.88–2.94 (m, 1H, 3-H), 3.68 (s, 3H, CH₃), 3.71–3.76 (m, 1H, 5-H), 4.0 (dd, $J=13.8$, 7.7 Hz, 1H), 4.05–4.10 (m, 1H), 4.41–4.47 (m, 1H), 4.73 (d, $J=13.8$ Hz, 1H), 5.21 (dd, $J=14.0$, 4.9 Hz, 1H), 7.46–7.54 (m, 2H_{aromatic}), 7.62–7.70 (m, 3H_{aromatic}), 7.80–7.86 (m, 2H_{aromatic}), 7.93–7.98 (m, 3H_{aromatic}). ^{13}C NMR (CDCl₃) δ : 28.07 (C(CH₃)₃), 30.09 (CH₂), 41.73 (CH), 51.13 (CH₂), 52.23 (CH₂), 52.45 (CH₃), 57.92 (CH), 64.03 (CH), 81.88 (C), 124.04 (CH), 124.14 (CH), 124.27 (CH), 124.65 (CH), 128.95 (CH), 129.24 (CH), 131.16 (CH), 131.21 (CH), 132.44 (CH), 132.67 (CH), 142.70 (2C), 148.36 (C), 148.43 (C), 154.65 (NCO₂), 172.07 (CO₂CH₃). MS (FAB m/z %): 634.20 (M+1, 100%). Anal. Calcd for $C_{29}H_{31}N_9O_8$ (633.61): C 54.97, H 4.93, N 19.90; found C 55.32, H 5.08, N, 19.65.

4.3. Cleavage of the tert-butyldiphenylsilyl group from compounds 7, 11 and 12a. General procedure

CF₃CO₂H (1.54 mL; 20.00 mmol) was added to a stirred suspension of the compound to be deprotected (1 mmol) in CH₂Cl₂ cooled (ice bath). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2–6 h, after which the solvent was removed under reduced pressure to give a solid residue, that was dissolved in NaOH 1 N (15 mL) and extracted with EtOAc (3×20 mL). The organic phase was concentrated to dryness and purified by column chromatography or washed with AcOEt/Et₂O.

4.3.1. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-3,5-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**9**).** Compound to be deprotected, **7**, reaction time 6 h, the brown residue was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 20/1) to give **9** as a yellow oil (76%). IR (KBr) ν : 3350, 2969, 2493, 1742, 1669, 1439, 1373, 1200, 1180, 1129, 1057, 837, 799, 722 cm^{-1} . 1H NMR (pyridine- d_5) δ : 2.41 (dt,

$J=12.6$, 9.1 Hz, 1H, 4-*HH*), 2.63 (dt, $J=12.6$, 7.3 Hz, 1H 4-*HH*), 3.21–3.29 (m, 1H, 3-H), 3.96 (s, 3H, CH₃), 4.33–4.50 (m, 5H, H-5+2CH₂OH), 5.09 (dd, $J=6.7$, 2.6 Hz, 1H, H-2), 6.45 (br s, 3H, D₂O exchange, NH+2OH). ^{13}C NMR (pyridine- d_5) δ : 30.43 (CH₂), 46.44 (CH), 52.79 (CH₃), 61.21 (CH), 62.22 (2CH₂), 62.33 (CH), 171.84 (CO). MS (EI m/z %): 189 (M, 11), 159 (35), 158 (60), 131 (14), 130 (100), 126 (10), 118 (10), 112 (21), 108 (11), 100 (70), 99 (11), 95 (11), 94 (12), 82 (49), 82 (14), 81 (69), 71 (18), 70 (93), 69 (84), 68 (30), 58 (18), 57 (34), 56 (43), 55 (18), 54 (17), 52 (41). HRMS m/z calcd for $C_8H_{15}NO_4$, 189.1001; found, 189.1013.

4.3.2. Methyl (2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis-[[4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (**13a**).** Compound to be deprotected, **12a**, reaction time 3 h, the brown oily residue was treated with a mixture of EtOAc/Et₂O to give **13a** as a colourless solid (88%), mp 159–161 °C. IR (KBr) ν : 3411, 2953, 1751, 1675, 1658, 1439, 1233, 1200, 1143, 770, 762, 698 cm^{-1} . 1H NMR (acetone- d_6) δ : 1.15 (dt, $J=26.3$, 7.04 Hz, 1H, 4-*HH*), 2.45–2.53 (m, 1H, 4-*HH*), 3.30–3.41 (m, 2H, one of them D₂O exchange NH), 3.70 (s, 3H, CH₃), 4.46–4.48 (m, 1H), 4.68–4.70 (m, 1H), 4.76–4.83 (m, 1H), 4.89–5.04 (m, 3H), 7.31–7.35 (m, 2H, 4-H C₆H₅+4'-H C₆H₅), 7.41–7.46 (m, 4H, 3-H+5-H C₆H₅ and 3'-H+5'-H C₆H₅), 7.86–7.91 (m, 4H, 2-H+6-H C₆H₅ and 2'-H+6'-H C₆H₅), 8.46 and 8.48 (2s, 2H, 5-H pyrazole+5'-H pyrazole). ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ : 32.45 (CH₂), 41.68 (CH), 49.61 (CH₂), 50.84 (CH₂), 53.23 (CH₃), 58.57 (CH), 58.55 (CH), 122.1 (CH), 122.38 (CH), 125.22 (CH), 127.99 (CH), 128.072 (CH), 128.96 (CH), 128.99 (CH), 130.51 (C), 130.64 (C), 146.46 (C), 146.48 (C), 168.36 (CO). MS (FAB m/z %): 443.24 (M, 40%). Anal. Calcd for $C_{24}H_{25}N_7O_2$ (443.50): C 65.0, H 5.68, N 22.11; found C 64.91, H 5.89, N, 22.34.

4.3.3. Methyl (2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidomethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**14**).** Compound to be deprotected, **11**, reaction time 2 h, the brown oily residue was treated with a mixture of EtOAc/Et₂O to give **14** as a colourless solid (80%), mp 104–106 °C. IR (KBr) ν : 2964, 2103, 1682, 1446, 1361, 1261, 1191, 1135, 1044, 834, 796, 723 cm^{-1} . 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 1.48–1.52 (m, 1H, 4-*HH*), 2.22–2.28 (m, 1H, 4-*HH*), 2.63–2.69 (m, 1H), 3.53–3.66 (m, 4H), 3.72–3.76 (m, 1H), 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.01 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, 2-H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 31.24 (CH₂), 41.15 (CH), 50.67 (CH₂), 51.38 (CH₂), 53.25 (CH₃), 58.0 (CH), 60.17 (CH), 168.62 (CO). MS (EI m/z %): 240 (M+1, 1), 184 (11), 183 (100), 180 (38), 126 (33), 106 (9), 95 (17), 94 (12), 82 (16), 80 (25), 69 (35), 68 (19), 59 (12), 56 (8), 55 (7), 54 (7), 51 (11). Anal. Calcd for $C_8H_{13}N_7O_2$ (239.23): C 40.16, H 5.48, N 40.98; found C 40.41, H 5.74, N, 41.14.

4.3.4. Methyl (2*R,3*S**,5*R**)-1-(tert-butoxycarbonyl)-3,5-bis(cyano-methyl)pyrrolidine-2-carboxylate (**15**).** NaCN (0.26 g, 5.38 mmol) and 18-crown-6 (0.03 g, 0.11 mmol) were added to a stirred solution of **10a** (0.30 g, 0.67 mmol) in dry CH₃CN (3 mL) at room temperature under argon. The mixture was heated at 60 °C for 23 h and allowed to cool down to room temperature. Et₂O (25 mL) was added and the resulting precipitate was filtered off and washed with Et₂O and EtOAc. The solvent was removed from the filtrate under reduced pressure to give an oily residue (0.22 g), which was purified by column chromatography on silica gel (7 g) (eluent, hexane/EtOAc 2:1). Compound **15** (0.126 g, 61%) was isolated as a colourless solid, mp 100–102 °C. IR (KBr) ν : 2876, 2372, 2251, 1757, 1695, 1401, 1352, 1208, 1138 cm^{-1} . 1H NMR (CDCl₃) δ : 1.37 [s, 6H, C(CH₃)₂], 1.46 [s, 3H, C(CH₃)], 1.76–1.80 (m, 1H, 4-*HH*), 2.52–2.68 (m, 4H), 2.86–2.93 (m, 1H), 3.16–3.24 (m, 1H), 3.74 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.06–4.14 (m, 2H, 2-H+5-H). ^{13}C NMR (CDCl₃) δ : 21.73 (CH₂), 22.94 (CH₂), 28.43 [[CH₃]₃], 35.76 (CH₂), 38.68 (CH), 52.94 (CO₂CH₃), 54.89 (CH), 65.67 (CH), 82.14 (C), 117.78 and 117.55 (2C≡N), 153.93 (NCO₂), 172.08 (CO₂CH₃). MS (EI m/z %): 251 [(M+1-*t*-Bu), 1], 206 (19), 167 (13), 149 (10), 148 (100), 59 (9), 57

(63). Anal. Calcd for $C_{15}H_{21}N_3O_4$ (307.34): C 58.62, H 6.89, N 13.67; found C 58.94, H 6.76, N, 13.83.

Single crystals suitable for X-ray diffractometry were obtained by dissolving crystals of **15** in the least possible quantity of cold acetone in an open vial that was then placed in a larger container with a little pentane in its bottom; the container was closed, and after a few days in a cool, dark place free from vibrations afforded the desired single crystals.

4.4. X-ray crystal structure determination of **15** (see Fig. 3)

Single crystals of compound **15** suitable for X-ray diffractometry were obtained by iterative recrystallization of the isolated product using acetone/pentane. The desired single crystals were mounted in an inert oil and transferred to the cold gas stream of the diffractometer. Empirical formula: $C_{15}H_{21}N_3O_4$; formula weight: 307.34; crystal size: $0.49 \times 0.36 \times 0.3 \text{ mm}^3$; crystal colour: colourless; habit: prismatic; crystal system: monoclinic; lattice type: plate; lattice parameters: $a=20.7171$ (8) Å, $b=8.8276$ (3) Å, $c=18.6784$ (5) Å, $\beta=111.073$ (2)°, $T=100 \text{ K}$, $V=3187.50$ (18) Å³; space group: $C2/c$; $Z=8$; $D \text{ calcd}=1.312 \text{ Mg m}^{-3}$; $\lambda=0.7107 \text{ Å}$. Diffractometer: Smart-1000 BRUKER APEX-II CCD.

4.4.1. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-1-(tert-butoxycarbonyl)-3,5-bis(methyloxymethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (16a) and methyl (2*R**,3*R**,5*R**)-1-(tert-butoxycarbonyl)-5-(hydroxymethyl)-3-(methyloxymethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (16b).** Ag₂O (0.24 g, 1.04 mmol) was added to a solution of **7** (0.10 g, 0.34 mmol) and CH₃I (1 mL) in CH₃CN (6 mL). The mixture was stirred and heated at 40 °C under argon for 60 h and allowed to cool down to room temperature. The solid was filtered off and washed with CH₃CN. The solvent was removed from the filtrate under reduced pressure to give a yellow oil (0.1 g), which was purified by column chromatography on silica gel (7 g) (eluent, hexane/EtOAc 1:0.25). Compound **16b** (0.05 g, 34%) was eluted first followed by **16a** (0.04 g, 36%).

Compound 16a. Yellow oil. IR (film) ν : 2977, 2931, 1749, 1705, 1446, 1367, 1258, 1199, 1177, 1139 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.47 [s, 3H, CH₃C(CH₃)₂], 1.47 [s, 6H, CH₃C(CH₃)₂], 1.80 (t, 1H, $J=13.3$, 4.1 Hz, 4-HH), 2.26 (dd, $J=8.9$, 13.3 Hz, 1H, 4-HH), 2.40–2.48 (m, 1H, 5-H), 3.33 (s, 2H, OCH₃), 3.37 (s, 2H, OCH₃), 3.38–3.51 (m, 2H), 3.73 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.67–3.80 (m, 2H), 4.06–4.09 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 28.18 [(CH₃)₃], 29.24 (CH₂), 42.49 (CH), 51.96 (CO₂CH₃), 57.64 (CH), 58.74 (OCH₃), 58.91 (OCH₃), 63.55 (CH), 73.26 (CH₂), 74.24 (CH₂), 89.41 (C), 154.30 (CON), 173.53 (CO). MS (EI m/z %): 172 [(M+1)–(O-*t*-Bu+CO₂CH₃)], 158 (13), 144 (14), 80 (20), 59 (7), 58 (7), 57 (100). MS (EI m/z %): 172 [(M+1)–(O-*t*-Bu+2OCH₃)], 12], 216 (18), 202 (16), 173 (9), 172 (100), 80 (11), 57 (48), 45 (17), 41 (11). HRMS m/z calcd for $C_{15}H_{27}NO_6$, 317.1838; found, 317.1845.

Compound 16b. Colourless oil. IR (film) ν : 3424, 2977, 2952, 2932, 1747, 1701, 1392, 1367, 1176, 1138 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.40 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.43–1.50 (m, 1H, 4-HH), 2.20 (dt, $J=12.9$, 7.7 Hz, 1H, 4-HH), 2.34–2.40 (m, 1H, 5-H), 3.30–3.33 (m, 1H), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 3.38–3.44 (m, 1H), 3.64–3.72 (m, 2H), 3.73 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.08–4.14 (m, 2H), 5.08 (br s, 1H, D₂O exchange, OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 28.14 [(CH₃)₃], 30.89 (CH₂), 41.81 (CH), 52.08 (CO₂CH₃), 58.94 (CH), 62.08 (OCH₃), 63.77 (CH), 67.19 (CH₂), 73.37 (CH₂), 81.43 (C), 156.23 (CON), 173.18 (CO). MS (EI m/z %): 172 [(M+1)–(Boc+OCH₃)], 63], 158 (13), 144 (14), 80 (20), 59 (7), 58 (7), 57 (100). HRMS m/z calcd for $C_{14}H_{25}NO_6$, 303.1682; found, 303.1695.

4.4.2. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-1-(tert-butoxycarbonyl)-5-(hydroxymethyl)-3-(ethyloxymethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (17b).** It was obtained from **7** in the same way as **16**, with CH₃CH₂I and purified by column chromatography on silica gel (eluent, hexane/EtOAc 1:1). Colourless oil. IR (film) ν : 3419, 2976, 2871, 1744, 1698, 1392, 1365, 1255, 1169, 1136 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.18 (dt, $J=1.2$,

7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.39 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.43–1.50 (m, 1H, 4-HH), 1.86 (br s, 1H), 2.17–2.24 (m, 1H, 4-HH), 2.35–2.41 (m, 1H, 5-H), 3.32–3.38 (m, 1H), 3.42–3.51 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.64–3.67 (m, 2H), 3.71 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.07–4.12 (m, 2H), 5.09 (m, 1H, D₂O exchange, OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 28.14 [(CH₃)₃], 30.13 (CH₂), 41.99 (CH), 52.02 (CH₂), 52.20 (CO₂CH₃), 62.17 (OCH₃), 63.92 (CH), 66.54 (CH₂), 67.15 (CH₂), 71.21 (CH₂), 81.39 (C), 156.17 (CON), 173.21 (CO). MS (EI m/z %): 318 [(M+1), 10], 263 (14), 262 (100), 218 (54), 186 (18), 80 (14), 68 (18), 59 (23), 57 (65). HRMS m/z calcd for $C_{15}H_{27}NO_6$, 317.1838; found, 317.1854.

4.4.3. Methyl (2*R,3*R**,5*R**)-1-(tert-butoxycarbonyl)-5-[[[(3,5-dinitrobenzoyl)oxy]methyl]-3-(methoxymethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (18).** A solution of **16b** (160 mg, 0.53 mmol) in dry THF (9 mL) was added to a mixture of 3,5-dinitrobenzoyl chloride (182 mg, 0.79 mmol), DMAP (4.0 mg) and Et₃N (0.08 mL). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 45 h under argon, and allowed to cool down to room temperature. The THF removed under reduced pressure and the residue was partitioned between NaHCO₃ (50 mL) and EtOAc (30 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3×30 mL) and the combined organic phases were washed with saturated aqueous NaCl (2×30 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give an oily residue (0.18 g), which was purified by column chromatography on silica gel (15 g) (eluent, hexane/EtOAc 6:1). Compound **18** (0.12 g, 46%) was isolated as an oil. IR (film) ν : 2977, 1743, 1694, 1438, 1393, 1352, 1168, 1141, 955, 830 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.34 [s, 6H, CH₃C(CH₃)₂], 1.47 [s, 3H, CH₃C(CH₃)₂], 1.74–1.83 (m, 1H, 4-HH), 2.32–2.42 (m, 1H, 4-HH), 2.44–2.51 (m, 1H, 5-H), 3.34 (s, 3H, OCH₃), 3.38–3.54 (m, 2H), 3.73 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.18–4.24 (m, 1H), 4.43–4.56 (m, 2H), 4.63–4.71 (m, 1H), 9.13–9.21 (m, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 28.07 [(CH₃)₃], 29.08 (CH₂), 42.51 (CH), 52.16 (CO₂CH₃), 56.37 (CH), 58.89 (CH), 63.51 (CH), 67.79 (CH₂), 73.76 (CH₂), 80.88 (C), 122.32 (CH), 122.52 (CH), 129.53 (CH), 133.94 (C), 148.61 (C), 154.41 (CON), 162.39 (CO), 173.18 (CO). HRMS m/z calcd for $C_{21}H_{27}N_3O_{11}$, 497.1646; found, 497.1661.

Acknowledgements

The authors thank the Xunta de Galicia for financial support of this work under project PGIDIT05PXIB20301PR.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.tet.2010.06.053.

References and notes

- Imming, P.; Sinning, C.; Meyer, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 821.
- (a) Hruby, V. J.; Li, G.; Haskell-Luevano, C.; Shenderovich, M. *Biopolymers* **1997**, *43*, 219; (b) Gante, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699; (c) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244.
- Martins, M. B.; Carvalho, I. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9923.
- Karoyan, P.; Sagan, S.; Lequin, O.; Quancard, J.; Lavielle, S.; Chassaing, G. Substituted prolines: syntheses and applications in structure-activity relationship studies of biologically active peptides. In *Targets in Heterocyclic Systems. Chemistry and Properties*; Attanasi, O. A., Spinelli, D., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005; Vol. 8, pp 216–273.
- Yamamoto, H.; Murphy, L. J. *J. Endocrinol.* **1995**, *146*, 141.
- Mishra, R. K.; Chiu, S.; Chiu, P.; Mishra, C. P. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1983**, *5*, 203.
- Sara, V. R.; Carlsson-Skewir, C.; Bergman, T.; Jörnvall, H.; Roberts, P. J.; Crawford, M.; Hakansson, L. N.; Civalero, I.; Nordberg, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *165*, 766.
- Nilsson-Hakansson, L.; Civalero, I.; Zhang, X.; Carlsson-Skewir, C.; Sara, V. R.; Nordberg, A. *NeuroReport* **1993**, *4*, 1111.
- Saura, J.; Curatolo, L.; Williams, C. E.; Gatti, S.; Benatti, L.; Peeters, C.; Guan, J.; Dragunow, M.; Post, C.; Faull, R. L. M.; Gluckman, P. D.; Skinner, S. J. *M. NeuroReport* **1990**, *10*, 161.

10. Alonso de Diego, S. A.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; Pérez de Vega, M. J.; Casabona, D.; Cativiela, C.; González-Muniz, R.; Herranz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Río, J.; Jimeno, M. L.; García-López, M. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1392.
11. Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. S.; Willians, C. E.; Gluckman, P. D. *Brain Res.* **2001**, *922*, 42.
12. Guan, J.; Thomas, G. B.; Lin, H.; Mathai, S.; Bachelor, D. C.; George, S.; Gluckman, P. D. *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 892.
13. Svedin, P.; Guan, J.; Mathai, S.; Zhang, R.; Wang, X.; Gustavsson, M.; Hagberg, H.; Mallard, C. *Dev. Neurosci.* **2007**, *29*, 394.
14. Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldevogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R.; Gluckman, P. D. *Brain Res.* **2000**, *858*, 286.
15. Krishnamurthi, R.; Stott, S.; Maingay, M.; Faull, R. L. M.; McCarthy, D.; Gluckman, P. D.; Guan, J. *NeuroReport* **2004**, *15*, 1601.
16. Kanwar, J. R.; Kanwar, R. K.; Krissansen, G. W. *Brain* **2004**, *127*, 1313.
17. Aguado-Llera, D.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; Arilla-Ferreiro, E.; Barrios, V. *NeuroReport* **2004**, *15*, 1979.
18. Bickerdike, M. J.; Thomas, G. B.; Batchelor, D. C.; Sirimanne, E. S.; Leong, W.; Lin, H.; Sieg, F.; Wen, J.; Brimble, M. A.; Harris, P. W.; Gluckman, P. D. *J. Neurolog. Sci.* **2009**, *278*, 85.
19. Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 960.
20. Chiu, S.; Wong, Y. W.; Wan, Y. P.; Chiu, P.; Mishra, R. K. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **1983**, *7*, 739.
21. Dugave, C. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 1397.
22. Copeland, R. A.; Albright, C. F.; Combs, A. P.; Dowling, R. L.; Graciani, N. R.; Han, W.; Higley, C. A.; Huang, P. S.; Yue, E. W.; Dimeo, S. V. WO 2001068145 A2 20010920, 2001; *Chem. Abstr.* **2001**, *135*, 273218.
23. Maring, C. J.; Giranda, V. L.; Kempf, D. J.; Stoll, V. S.; Sun, M.; Zhao, C.; Gu, Y.-G.; Hanessian, S.; Wang, G. T.; Krueger, A. C.; Chen, H.-J.; Chen, Y.; DeGoey, D. A.; Flosi, W. J.; Grampovnik, D. J.; Kati, W. M.; Kennedy, A.; Klein, L. L.; Lin, Z.; Madigan, D. L.; McDaniel, K. F.; Muchmore, S. W.; Sham, H. L.; Stewart, K. D.; Tu, N. P.; Wagenaar, F. L.; Wang, S.; Wiedeman, P. E.; Xu, Y.; Yeung, M. C.; Bayrakdarian, M.; Luo, X. WO 2001028996 A2 200100426; *Chem. Abstr.* **2001**, *134*, 326397.
24. Maring, C. J.; Gu, Y. G.; Chen, H.-J.; Chen, Y.; DeGoey, D. A.; Flosi, W. J.; Giranda, V. L.; Grampovnik, D. J.; Kati, W. M.; Kempf, D. J.; Kennedy, A.; Klein, L. L.; Krueger, A. C.; Lin, Z.; Madigan, D. L.; McDaniel, K. F.; Muchmore, S. W.; Sham, H. L.; Stewart, K. D.; Stoll, V. S.; Sun, M.; Tu, N. P.; Wagenaar, F. L.; Wang, G. T.; Wang, S.; Wiedeman, P. E.; Xu, Y.; Yeung, M. C.; Zhao, C.; Hanessian, S.; Bayrakdarian, M.; Luo, X. US 6455571 B1 20020924, 2002; *Chem. Abstr.* **2002**, *137*, 247920.
25. Hiruma, T.; Kobayashi, K.; Inomata, S. WO 2003042176 A1 2003305222, 2003; *Chem. Abstr.* **2003**, *138*, 401619.
26. Robinson, J. A. *Synlett* **2000**, 429.
27. (a) Sabol, J. S.; Flynn, G. A.; Friedrich, D.; Huber, E. W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3687; (b) Mosberg, H. I.; Lomize, A. L.; Wang, C.; Kroona, H.; Heyl, D. L.; Sobczyk-Kojiro, K.; Ma, W.; Mousigian, C.; Porreca, F. J. *Med. Chem.* **1994**, *37*, 4371; (c) Lorthiois, E.; Marek, I.; Normant, J. F. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2442.
28. (a) Beeli, R.; Steger, M.; Linden, A.; Robinson, J. A. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2235; (b) Damour, D.; Doerflinger, G.; Pantel, G.; Labaudiniere, R.; Leconte, J.-P.; Sable, S.; Vuilhorgne, M.; Mignani, S. *Synlett* **1999**, 189.
29. (a) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 645; (b) Damour, D.; Barreau, M.; Blanchar, J. C.; Burgevin, M.-C.; Doble, A.; Pantel, G.; Labaudiniere, R.; Mignani, S. *Chem. Lett.* **1998**, 943.
30. Duan, S.; Moeller, K. D. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6407.
31. (a) Merino, I.; Santosh Laxmi, Y. R.; Flórez, J.; Barluenga, J.; Ezquerro, J.; Pedregal, C. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 648; (b) Mitchinson, A.; Nadin, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 2862; (c) Ashley, E. R.; Cruz, E. G.; Stoltz, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15000; (d) Maison, W.; Grohs, D. C.; Prenzel, A. H. *G. P. Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1527; (e) Maison, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2276.
32. Jaeger, M.; Polborn, K.; Steglich, W. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 861.
33. Arakawa, Y.; Yasuda, M.; Ohnishi, M.; Yoshifuji, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 255.
34. Maison, W.; Adiwidjaja, G. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 861.
35. Blanco, J. M.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E.; Rodríguez-Hergueta, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5663.
36. Rodríguez-Borges, J. E.; Vale, M. L. C.; Corrêa, C. M. S.; Fernández, F.; García-Mera, X. *Book of Abstracts P50*, 4th Encontro Nacional de Química Orgânica, Coimbra, September 26–28, 2001.
37. (a) Bailey, P. D.; Londebrough, D. J.; Hancox, T. C.; Heffernan, J. D.; Holmes, A. B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2543; (b) Bailey, P. D.; Millwood, P. A.; Smith, P. D. *Chem. Commun.* **1998**, 633.
38. Rodríguez-Borges, J. E.; Vale, M. L. C.; Pacheco, T.; Girao, S.; Teixeira, C.; Fernández, F.; García-Mera, X. *Book of Abstracts P115*, XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Terapéutica, Santiago de Compostela, September 9–12, 2003.
39. (a) Santos, T. P.; Caamaño, O.; García Mera, X.; Borges, J. E. R.; Vale, M. L. C. *Book of Abstracts P57*, 6th Encontro Nacional de Química Orgânica, Universidade do Minho, Braga, Portugal, July 20–22, 2005. (b) Alves, M. J.; García-Mera, X.; Vale, M. L. C.; Santos, T. P.; Aguiar, F. R.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7595.
40. Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10951.
41. Zhong, Y.-L.; Shing, T. K. M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2622.
42. Santos, T. 'Síntese de Isozanucleósidos com Potencial Actividade Antiviral e Anti-neoplásica', Tese de Seminário, Faculdade de Ciências, Universidade de Porto, 2004.
43. Huisgen, R. In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Pawda, A., Ed.; Wiley: New York, NY, 1984; Vol. 1, pp 1–176.
44. Pérez-Castro, I.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García, M. D.; López, C.; De Clercq, E. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3805.
45. Amat, M.; Escolano, C.; Lozano, O.; Gómez-Esqué, A.; Grier, R.; Molins, E.; Bosch, J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3804.
46. Malpass, J. R.; Patel, A. B.; Davies, J. W.; Fulford, S. Y. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9348.
47. The crystallographic data of **15** have been deposited at the Cambridge crystallographic Data Centre as Supplementary Publications, CCDC 779237. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.
48. Ng, E. W.; Aung, M. M.; Abood, M. E.; Martin, B. R.; Razdan, R. K. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1975.



This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Synthesis and Allosteric Modulation of the Dopamine Receptor by Peptide Analogs of L-Prolyl-L-Leucyl-L-Glycinamide (PLG) Modified in the L-Proline or L-Proline and L-Leucine scaffolds

Journal:	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Caamaño, Olga; University of Santiago de Compostela, Organic Chemistry Ferreira da Costa, Joana; USC, Fernández, Franco; USC, Garcia-Mera, Xerardo; USC, Sampaio-Dias, Ivo E.; Universidade do Porto, CIQ_dpto. de Química Brea, Jose; Universidad de Santiago de Compostela, Department of Pharmacology Cadavid, Maria Isabel; Universidad de Santiago de Compostela, Department of Pharmacology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Synthesis and Allosteric Modulation of the Dopamine Receptor by Peptide Analogs of L-Prolyl-L-Leucyl-L-Glycinamide (PLG) Modified in the L-Proline or L-Proline and L-Leucine scaffolds

Joana Ferreira da Costa,^a Olga Caamaño,^{a,b*} Franco Fernández,^{a,b} Xerardo García-Mera,^{a,b} Ivo E. Sampaio-Dias,^{a,d} José Manuel Brea,^{b,c} María Isabel Cadavid.^{b,c}

^aDepartamento de Química Orgánica, Facultade de Farmacia, Campus Vida s/n, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782, Spain.

^bInstituto de Farmacia Industrial, Facultade de Farmacia Campus Vida s/n, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782, Spain.

^cCentro de Investigación CIMUS, Campus Vida s/n, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain.

^dCIQ-Departamento de Química, Facultade de Ciencias, Universidade de Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007, Porto, Portugal

ABSTRACT

Novel analogs of L-prolyl-L-leucylglycinamide (PLG) were synthesized wherein the prolyl residue was replaced with other amino acids based on a 3,5-disubstituted proline scaffold. In some examples, the L-leucyl residue was also replaced by L-valine. These analogs were tested for their ability to enhance the binding of [³H]-N-propylnorapomorphine to dopamine D₂ receptors from human striatal membranes.

Compounds **18b** and **19b**, increased [³H]NPA binding at concentrations between 10⁻¹² and 10⁻⁹ M, which is similar to the effect of PLG in this assay and, provides evidences that these compounds are acting as allosteric modulators of dopamine D₂ receptors.

Introduction

In recent years small heterocyclic molecules have attracted considerable attention and, amongst these, proline-derived structures constitute a particularly interesting class of compound.^{1,2} In this context, the cyclic α -amino acids are synthetically interesting targets because they can be used as building blocks for the synthesis of peptidomimetic structures with biological activity.³ Various biological activities, from antiviral activities to neuroprotective properties in different animal models of neurodegenerative processes, such as Huntington's, Parkinson's, and Alzheimer's diseases,⁴⁻⁶ have been assigned to members of this group of compounds.

The structural simplicity of the neuropeptide L-prolyl- L -leucyl-glycinamide (PLG) make it a suitable lead molecule for the development of novel strategies for the enlargement of new drugs of sufficiently low molecular weight and lipophilicity to cross the blood-brain barrier.

PLG, also known as melanocyte-stimulant hormone release-inhibiting factor has been shown to possess a variety of pharmacological activities in the central nervous system.⁷ PLG and its analog (3*R*)-[(2*S*)-pyrrolidylcarbonyl]amino-2-oxo-1-pyrrolidineacetamide (PAOPA) (Figure 1) modify dopaminergic neurotransmission by acting as allosteric modulators of the dopamine D₂ receptor. These compounds have been shown to increase agonist binding to DA D₂ receptors without affecting antagonist binding, and prevent conversion of high-affinity state DA receptors (D₂ High) to their low-affinity state (D₂ Low).⁸⁻¹⁰

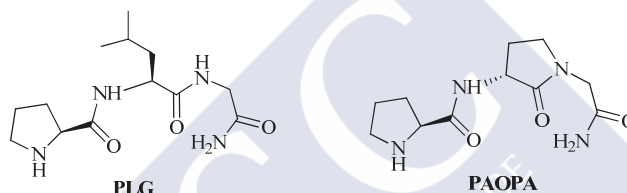


Figure 1. Structures of PLG and PLG peptidomimetic PAOPA

Interestingly, PLG has recently been shown to up regulate c-Fos expression in dopaminergic regions,¹¹ although it is also able to reduce haloperidol-induced up regulation of c-Fos.¹² This raises the possibility that modulation of D₂ receptors via PLG may cause functionally selective signalling through non-classical dopamine D₂ receptor pathways, depending on cellular context and dopaminergic tone.

The precise mechanism of action behind PLG's ability to modulate the dopamine receptor is unclear, but studies with different photoaffinity-labeling ligands¹³ show activity in enhancing the binding of the dopamine D₂ receptor agonist [³H]-*N*-propylnorapomorphine ([³H]NPA). These ligands serve as useful probes in delineating the allosteric binding site on the dopamine D₂ receptor and in identifying the residues within the PLG binding site where the interactions take place. Studies carried out in cell lines transfected with human dopamine receptor subtypes have shown that PLG and PLG peptidomimetic enhance agonist binding to the D_{2S}, D_{2L}, and D₄ subtypes.¹⁴ The actions of PLG appear to be specific toward dopamine receptors because PLG does not interact with other aminergic receptors such as J -adrenergic,⁹ serotonergic¹⁵ or GABA-ergic¹⁶ receptors.

With these aims in mind, we¹⁷ and others have embarked on a synthetic program focused on the modification of the amino acids residues, in order to investigate the importance of the different

amino acid residues in PLG. This approach led to the successful development of numerous PLG peptidomimetics,^{13,18-23} one outstanding example of which was PAOPA. This compound is about 100 times more potent than PLG in potentiating apomorphine-induced rotational behavior in 6-OHDA-lesioned rats²⁴ and it attenuates haloperidol-induced vacuous chewing movements in rats,²⁵ and haloperidol-induced c-fos expression,¹² amongst other effects.

Results and discussion

In a previous publication,¹⁷ we described the synthesis of 3,5-disubstituted proline derivatives as potential scaffolds in the synthesis of peptides with pharmacological activity. In order to investigate the importance of the L-proline and L-leucine residues in PLG, several analogs modified at either L-Pro or the L-Pro-L-Leu peptide bond were synthesized. The general synthetic strategy involved the reaction of a carboxylic acid with an amine to render an amide – a process that requires activation of the carboxylic acid, which is often carried out through an active ester that is normally prepared in situ by the use of carbodiimides or onium salts. In general, amide bond formation mediated by uranium salts and other onium salts involves two steps: activation, in which the coupling reagent reacts with an *N*-protected amino acid to form an active carboxyl, and coupling, whereby the active carboxyl reacts with the amino component to form the peptide bond.²⁶ Among the current reagents of choice for peptides bond formation are aminium/uronium derivatives, such as 2-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate] (TBTU),²⁷ which was the coupling agent used (Schemes 1 and 2) for the formation of the peptidic bond between the diazide acid **2** (prepared from **1**¹⁷) and L-leucine or L-valine methyl ester hydrochlorides and the subsequent synthesis of the PLG mimics.

The synthetic route for peptidomimetics of PLG **8–10** is shown in Scheme 1. The conversion of the methyl ester **1** to the acid **2** was practically quantitative on using LiOH in a mixture of THF and H₂O at room temperature. The pH was adjusted to 4–4.5 by the dropwise addition of 1 M H₂SO₄ and the subsequent elimination of H₂O to dryness to give a solid residue, which was extracted hot with a mixture of ether/ethanol (1/3). The removal of solvents to dryness led to carboxylic acid **2** in excellent yield. However, small deviations in the acidification process (pH below 4) lead to a mixture of compounds **2** and **3** (Figure 2), of which a small portion of the latter was separated by crystallization.

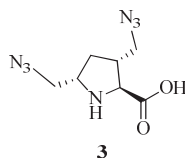


Figure 2. Structure of compound **3**

The acid **2** was coupled to L-leucine methyl ester hydrochloride using TBTU in CH_2Cl_2 with DIPEA (diisopropyl ethyl amine) give an excellent yield (96%) of the mixture of diastereoisomers **4a** and **4b**, which were separated by flash column chromatography. The absolute configuration of dipeptide **4a** was unequivocally determined by X-ray analysis of a single crystal (see figure 3).²⁸ This analysis confirmed the absolute configuration of the other stereoisomer **4b** and consequently of each of the compounds (**5–11**) from them. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of diastereomers **4a** and **4b** showed the existence of two rotamers about the carbamate bond in a ratio of approximately of 1:3 in CDCl_3 .

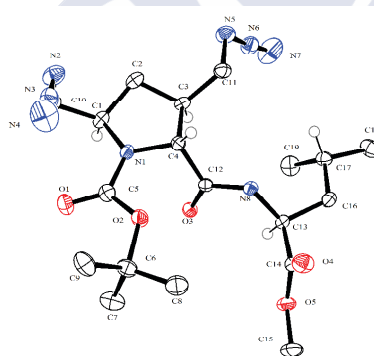
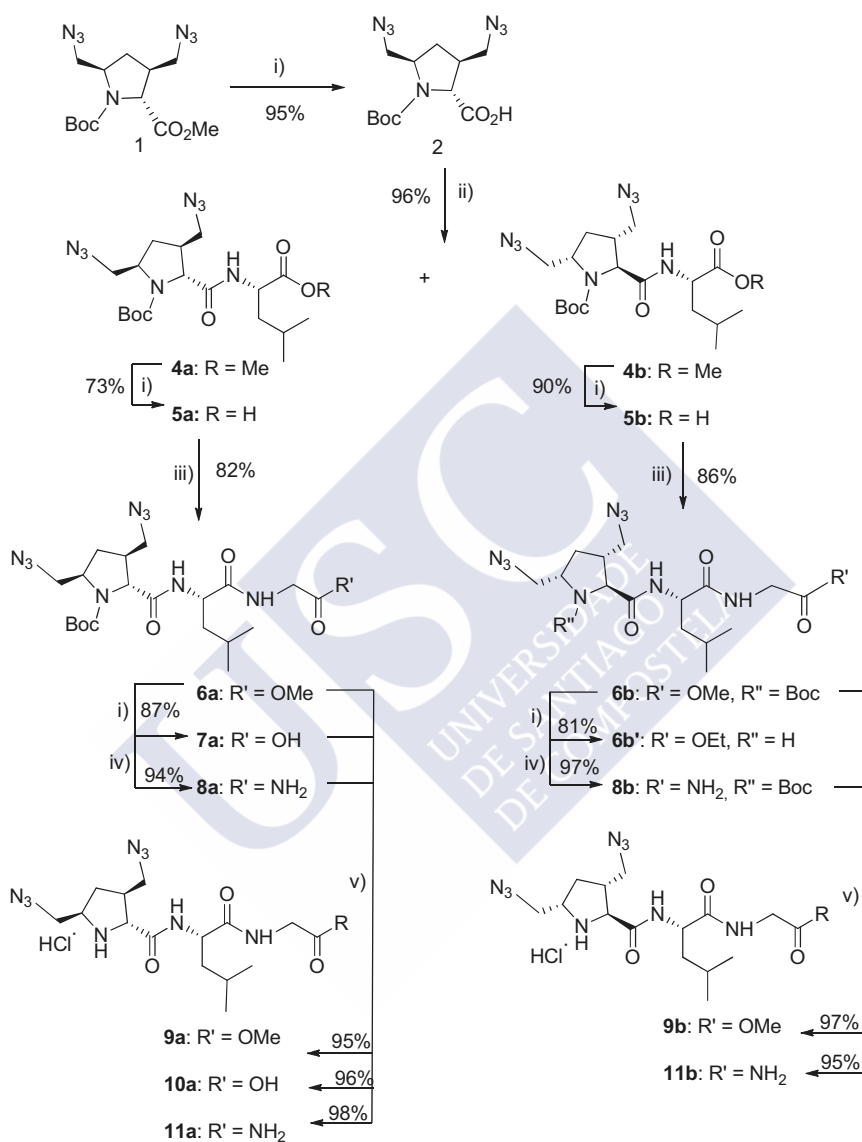


Figure 3. ORTEP drawing of the X-ray single crystal structure of **4a**.

Hydrolysis of the methyl ester dipeptides **4a** and **4b** was achieved by treatment with LiOH in a mixture of THF and H_2O at room temperature, followed by the coupling of the corresponding carboxylic acids **5a** and **5b** with glycine methyl ester hydrochloride, which gave the tripeptide esters **6a** and **6b**. Compound **6a** was converted to the corresponding carboxylic acid **7a** with LiOH in THF/ H_2O . Nevertheless, the hydrolysis of **6b** with LiOH again showed the high lability of the carbamate group; if during the acidification process with 1 M H_2SO_4 the pH is equal to 4 the Boc protective group is lost and simultaneous transesterification occurred. In this case, the ethyl ester **6b'** was isolated after the reaction work-up (extraction in hot ether/ethanol of the dry residue of the reaction mass).



The transformation of **6a** and **6b** into the correspondig primary amides **8a** and **8b** was achieved by treatment with methanolic ammonia. Finally, removal of the Boc protecting group from **6a–8a** and

6b and **8b** by reaction with 4N HCl in dioxane, afforded the corresponding **9a–11a**, **9b** and **11b** PLG analogs with excellent yields.

The replacement of the amino acid L-leucine by L-valine for the formation of the dipeptide was achieved by a similar synthetic route (Scheme 2) to prepare a new family of PLG mimics (compounds **17a–19a**, **17b–19b**) that are lower homologs by one carbon atom. Again, after the first coupling reaction, in this case between carboxylic acid **2** and L-valinyl methyl ester hydrochloride, it was possible to resolve the two diastereoisomers dipeptides **12a** and **12b**. The absolute configuration of dipeptide **12a** was unequivocally determined by X-ray analysis of a single crystal (see figure 4).²⁸ This analysis confirmed the absolute configuration of the other stereoisomer **12b** and consequently, of each of the compounds (**13a–19a** and **13b–19b**) derived from the two aforementioned stereoisomers.

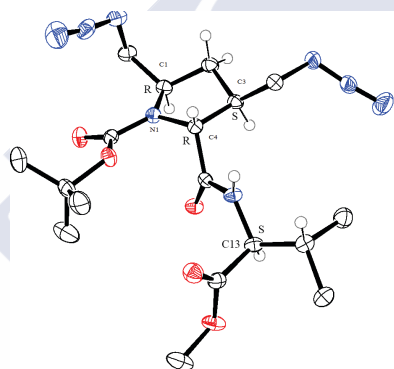
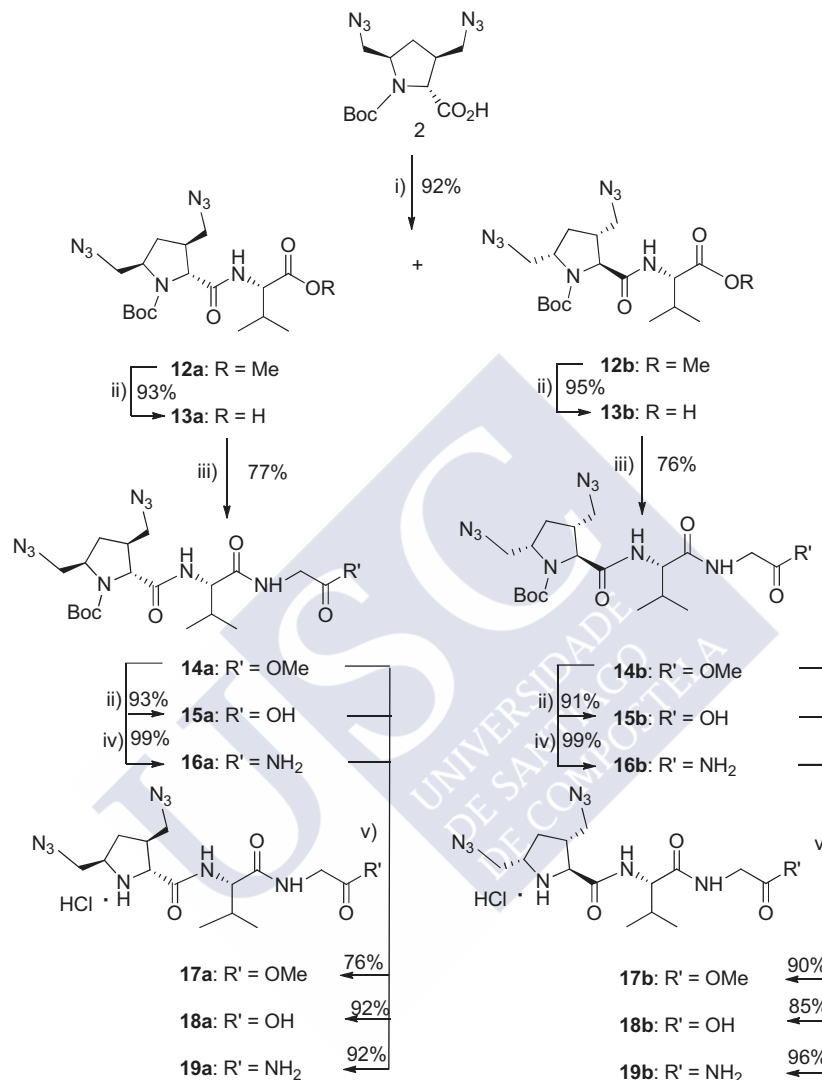


Figure 4. ORTEP drawing of the X-ray single crystal structure of **12a**.



Scheme 2: i) L-valine methyl ester hydrochloride, TBTU, DIPEA, CH₂Cl₂, 15 h, rt; ii) LiOH, THF/H₂O, rt; iii) glycine methyl ester hydrochloride, TBTU, DIPEA, CH₃CN, 17 h, rt; iv) NH₃, MeOH, rt; v) 4 M HCl in dioxan, 3h, rt.

The proline five-membered ring may adopt two distinct puckered conformations (because the side chain is bonded to the amide nitrogen and the N-C^α rotation is restrained at about -60°) and both of these are frequently encountered in X-ray structures of peptides.³⁰ Carbamates have a similar structural unit to amides but the additional oxygen is expected to cause structural and electronic

perturbations in the amide unit;³⁰ one consequence of this difference is that the barriers to rotation in carbamates are usually 3–4 kcal/mol (about 15–20%) lower than those in the corresponding amides.³¹ During a study on the catalysis of *cis-trans* amide and carbamate isomerization, Cox and Lectka³² observed that the barriers to rotation (ΔG^\ddagger) in prolyl carbamates were surprisingly insensitive to solvent effects. These authors suggested that the lower barriers to rotation of carbamates could be ascribed to the reduced interaction between the nitrogen lone pair and the carbonyl group due to the competing interaction between the ester oxygen and the carbonyl group when C–N bond rotation takes place. Studies on *N*-methoxycarbonyl-L-proline-*N'*-methylamide showed that replacement of the *N*-amide group by the *N*-carbamate group results in changes in the conformational preferences.³³

These effects were observed to a greater or lesser extent in the majority the dipeptides **4**, **5**, **12** and **13** and tripeptides **6–8** and **14–16** in solution, as evidenced by the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of a number of these compounds, which showed the presence of several signals for the same proton or carbon due to the presence of different rotamers in solution. The presence of rotamers in solution is primarily attributable to the rotation around the carbamate link, since this situation is practically not detected in the NMR spectra of the hydrochlorides of the corresponding tripeptides **9–11** and **17–19** after removal of the Boc group.

An infrared study also provided evidence of rotamers in peptides in the solid state.^{34,35} Hydrogen-bond formation in various types of polypeptide secondary structures is known to shift amide I bands of the carbonyl groups to lower frequency. In one of our compounds, the infrared spectrum of the tripeptide derivative **14a** showed the duplication of the signals in NH and C=O stretching regions.

Pharmacology

Eleven novel PLG mimetics based on a 3,5-disubstituted proline scaffold were tested for their ability to potentiate the binding of the dopamine receptor agonist [³H]NPA to cloned human dopamine D₂ receptors, as described by Verma et al.¹⁴ These compounds were tested for their ability to increase [³H]NPA binding at three different concentrations: 0.01, 0.1 and 1 nM. The data obtained for PLG analog photoaffinity-labeling agents **9a**, **9b**, **10a**, **11a**, **11b**, **17a**, **17b**, **18a**, **18b**, **19a** and **19b** are shown (Figura 5) and their activity was compared to that of PLG itself.

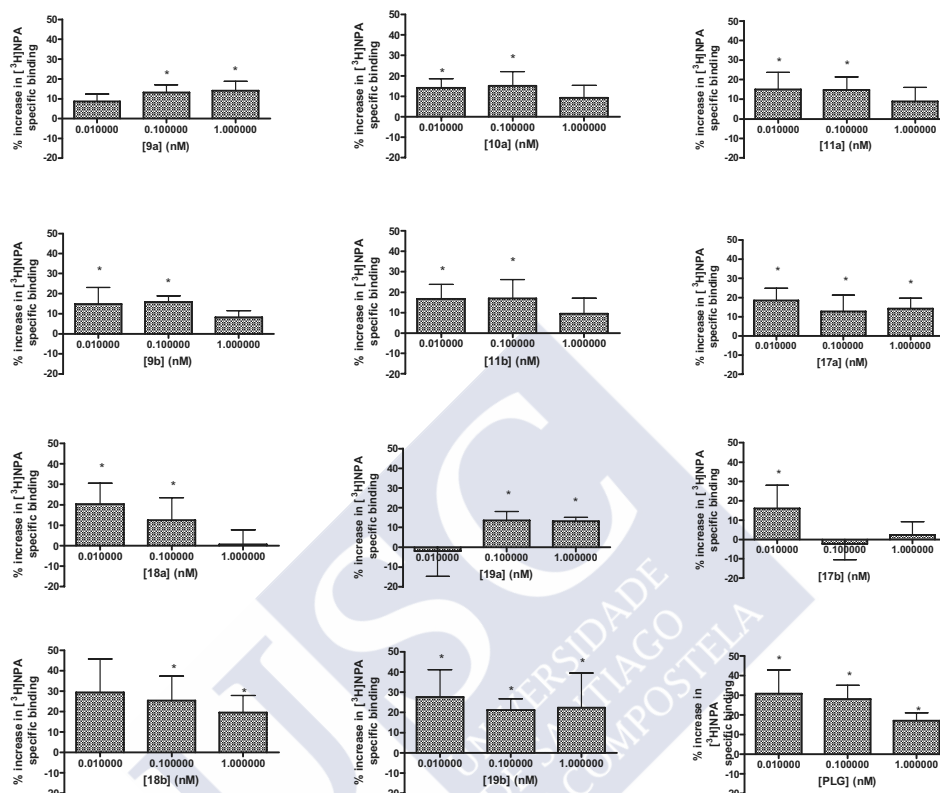


Figure 5. Modulation of $[^3\text{H}]\text{NPA}$ binding exerted by the different compounds at 10^{-11} , 10^{-10} and 10^{-9} M. Columns represent the mean \pm standard deviation (vertical bars) of three independent experiments carried out with duplicate points. * $P < 0.05$ (ANOVA test; post-hoc Dunnett T3 test).

All the derivatives significantly ($P < 0.05$; ANOVA test; post-hoc Dunnett T3 test) increased $[^3\text{H}]\text{NPA}$ binding at least at one of the concentrations evaluated. Of the new compounds, derivatives **18b** and **19b** showed the most similar profiles to PLG, with increases of $[^3\text{H}]\text{NPA}$ binding of around 30–40%. Therefore new assays were carried out on these two compounds and PLG by studying 8 different concentrations (from 10^{-12} to 10^{-5} M) (Figura 6).

Both **18b** and **19b** increased $[^3\text{H}]\text{NPA}$ binding at concentrations between 10^{-12} to 10^{-9} M while significant differences were not observed for the other concentrations tested, with similar profiles to PLG observed. The data provide evidence that these compounds act as allosteric modulators of

dopamine D₂ receptors by increasing the binding of the agonist radioligand [³H]NPA to this preparation.

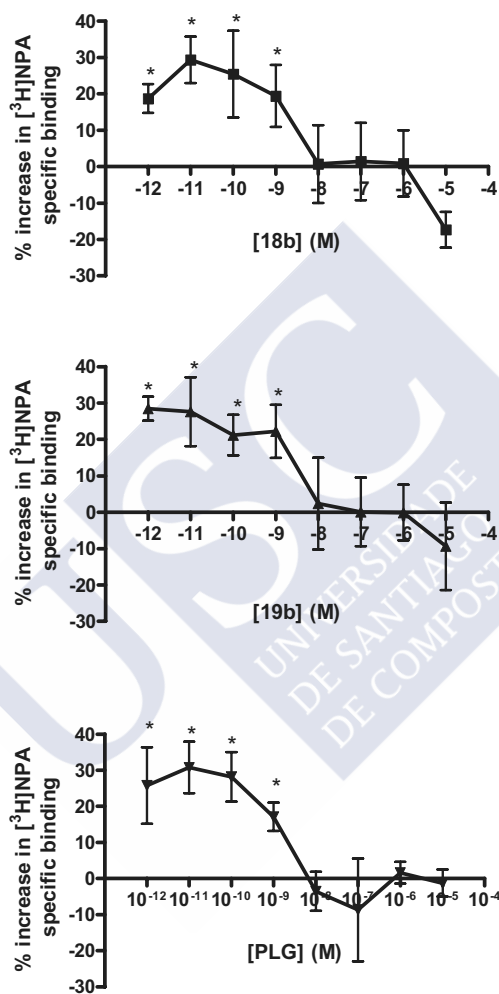


Figure 6. Modulation of [³H]NPA binding exerted by **18b**, **19b** and PLG at 8 different concentrations in the range between 10⁻¹²–10⁻⁵ M. Points represent the mean ± standard deviation (vertical bars) of three independent experiments carried out with duplicate points. * *P* < 0.05 (ANOVA test; post-hoc Dunnet T3 test).

Experimental Section

General methods

All chemicals were of reagent grade and were obtained from Aldrich Chemical Co. and used without further purification. All air sensitive reactions were carried out under argon. Flash chromatography was performed on flash silica gel SDS type 60 A. C. C., 35–70 μm , and analytical TLC was carried out on pre-coated silica gel plates (Merck 60 F₂₅₄, 0.2 mm). Melting points were measured on a Reichert Kofler Thermopan apparatus and are uncorrected. Na-D line polarimetry was carried out at 25 °C on a Perkin-Elmer 241 polarimeter. Infrared spectra were recorded on a JASCO FT/IR-4100 spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300 or a Varian Inova 400 spectrometers at 300 or 400 and 75 or 100 MHz, respectively, using TMS as an internal standard (chemical shifts in δ values, J in hertz). Mass spectra were recorded on Micromass Autospec or Bruker Microtof spectrometers. Microanalyses were performed on a Thermo Finnigan Flash 1112 Elemental Analyser; all results shown are within < 0.4% of the theoretical values. X-ray crystal structure determinations were carried out on an APPEX II (Bruker Kappa) diffractometer at low temperature (100 K).

(±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid (2).** To a stirred solution of **1** (1.60 g, 4.71 mmol) in THF (6 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of LiOH (1.41 g, 58.87 mmol) in THF/H₂O (1/1) (53 mL) and the reaction mixture was stirred for 0.5 h, warmed to room temperature and stirred for a further 65 h. The THF was removed and the residue was dissolved in H₂O (20 mL) and this solution was adjusted to pH 4–5 with 1M H₂SO₄. The solution was concentrated to give a white solid, which was triturated with warm Et₂O/EtOH (1:3) (200 mL) to afford, after concentration, a white solid (1.45 g, 95%); mp = 88–89 °C. IR (solid) ν : 2976, 2936, 2098, 1672, 1613, 1395, 1368, 1257, 1141, 775 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 3.92–3.85 (m, 1H), 3.54–3.50 (m, 2H), 3.38–3.31 (m, 1H), 3.05 (br s, 1H, D₂O exchange, CO₂H), 2.54–2.49 (m, 1H), 2.39–2.32 (m, 1H), 1.78–1.70 (m, 1H), 1.49 (s, 9H, 3 CH₃), 1.41–1.39 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 178.54 (C), 155.56 (C), 81.85 (C), 66.44 (CH), 57.24 (CH), 54.14 (CH₂), 54.05 (CH₂), 40.80 (CH), 31.63 (CH₂), 28.43 (3 CH₃). EI MS m/z (%): 325 (M, 1), 225 (7), 181 (2), 180 (21), 169 (16), 126 (4), 85 (4), 80 (4), 71 (5), 69 (7), 68 (9), 57 (43), 56 (100), 55 (37).

(±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-Bis(azidomethyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid (3).** Compound **1** (600 mg, 1.77 mmol) in THF (5 mL) was converted to carboxylic acid **3** by the same procedure as used to make **2**, except that in the work-up process a pH below 4 was obtained. The removal of solvents led to a solid residue (500 g) mixture of **2** and **3** (¹H NMR), from which **3** (30 mg, 7.5%) was isolated by recrystallization from EtOH/H₂O, white solid, mp = 185–187 °C. IR (solid) ν : 2937, 2539, 2103, 1726, 1612, 1402, 1355, 1268, 1014, 977, 732 cm⁻¹. ¹H NMR (pyridine-*d*₅) δ : 10.30 (br

s, 2H, D₂O exchange, NH and CO₂H), 4.16 (d, J = 6.9 Hz, 1H, 2-H), 3.83 (dd, J = 12.2, 5.9 Hz, 2H, CH₂N₃ in C-5), 3.66 (dd, J = 12.1, 7.4 Hz, 1H, 5-H), 3.51 (d, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂N₃ in C-3), 2.81 and 2.76 (AB part ABM system, J = 15.0, 7.3 Hz, 1H), 2.22 (dt, J = 12.4, 7.2 Hz, 1H, 4-HH), 1.64 (dt, J = 12.4, 9.5 Hz, 1H, 4-HH). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅) δ : 173.57 (C), 61.54 (CH), 57.18 (CH), 52.89 (2 CH₂), 42.54 (CH), 32.37 (CH₂). EI MS m/z (%): 225 (M, 1), 127 (12), 1265 (11), 118 (20), 113 (15), 111 (20), 99 (20), 97 (15), 85 (50), 84 (11), 83 (25), 71 (171), 70 (16), 57 (100), 55 (36).

Methyl D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-leucinate (4a) and methyl L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-leucinate (4b). To a solution of the proline mimic **2** (0.95 g, 2.92 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) at 0 °C under argon was added TBTU (1.49 g, 4.64 mmol) and the resulting suspension was stirred for 30 min at 0 °C. L-Leucine methyl ester hydrochloride (0.64 g, 3.50 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) and DIPEA (2.04 mL, 11.7 mmol) were added, and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and at room temperature until complete consumption of the starting material (TLC) (15 h). The solvent was removed in vacuo, the residue was dissolved in EtOAc (200 mL) and this solution was washed with saturated aq. NaHCO₃ (2 x 100 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash column chromatography with a hexane/EtOAc 5:1 as eluent to afford the corresponding dipeptides. Compound **4a** (0.65 g, 49%), eluted first, followed by a mixture of **4a** + **4b** (0.35 g, 27%) and finally **4b** (0.26 g, 20%).

Compound **4a**: white solid, mp = 77–78 °C. $[\alpha]_D^{25}$ –35.6 (c 1.1, MeOH). IR (solid) ν : 3288, 2961, 2095, 1748, 1698, 1654, 1541, 1365, 1255, 1195, 1138, 1012, 784 cm^{–1}. ¹H NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 6.50 and 6.01 (2 br s, 1H, D₂O exchange, NH), 4.61–4.55 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4.12–4.03 (m, 1H, 2-H_{Pro}), 3.99–3.95 (m, 2H, one of them 5-H_{Pro}), 3.71 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.54–3.42 (m, 3H), 2.34–2.22 (m, 2H), 1.67–1.49 (m, 4H), 1.36 (s, 9H, 3 CH₃), 0.92 (d, J = 4.5 Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu}). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 173.12 (C), 171.61 (C), 154.16 (C), 81.21 (C), 65.43 (CH), 57.80 (CH), 54.14 (CH₂), 52.46 (CH₂), 52.31 (CH₃), 50.58 (CH), 41.92 (CH₂), 30.90 (CH₂), 29.68 (CH), 28.12 (3 CH₃), 24.87 (CH), 22.72 and 21.93 (2 CH₃). ESI-TOF MS m/z (%): 475.2 [(M + Na)⁺, 100].

X-ray crystallography of 4a. Single colorless crystals of **4a** suitable for X-ray diffractometry were obtained by iterative recrystallization of the isolated product using ether/isooctane. The desired single crystals were mounted in an inert oil and transferred to the cold gas stream of the diffractometer. Empirical formula: C₁₉H₃₂N₈O₅; formula weight: 452.53; crystal size: 0.28 × 0.16 × 0.11 mm; crystal color: colorless; habit: prismatic; crystal system: orthorhombic, space group

$P2_12_12_1$; lattice parameters: $a = 9.7233$ (5) Å, $b = 11.6925$ (8) Å, $c = 20.8183$ (17) Å; at 100 K, $V = 2366.8$ (3) Å³, and $Z = 4$ { D calcd = 1.27 Mg m⁻³, $\mu = 0.09$ mm⁻¹}.

Compound **4b**: white solid, mp = 63–65 °C. $[\alpha]^{25}_D$ 2.8 (c 1.02, MeOH). IR (solid) ν : 3275, 2959, 2097, 1740, 1687, 1656, 1554, 1367, 1254, 1195, 1140, 1026, 790 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 6.23 and 5.90–5.92 (br s and m, 1H, D₂O exchange, NH), 4.61–4.57 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4.12–3.96 (m, 3H), 3.72 (s, 3H, CH₃), 3.55–3.39 (m, 3H), 2.40–2.26 (m, 2H), 1.70–1.49 (m, 4H), 1.45 (s, 3H, CH₃), 1.40 (s, 6H, 2 CH₃), 0.93 (m, 6H, 2 CH_{3Leu}). ¹³C NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 173.24 (C), 171.83 (C), 154.25 (C), 81.44 and 80.92 (C), 65.05 (CH), 57.85 and 57.25 (CH), 54.28 and 54.06 (CH₂), 52.54 (CH₂), 52.37 (CH), 50.83 (CH₃), 41.96 (CH), 41.57 (CH₂), 31.98 and 30.67 (CH₂), 28.15 (3 CH₃), 24.82 and 24.55 (CH), 21.76 (2 CH₃). CI MS m/z (%): 453 [(M + 1)⁺, 1], 354 (26), 353 (100), 310 (14), 297 (25), 296 (59), 282 (18), 180 (64), 152 (15), 86 (15), 68 (23), 57 (51), 56 (13).

D-[(3R,5S)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(tert-butoxycarbonyl)]prolyl-L-leucine (5a). The methyl ester **4a** (0.65 g, 1.44 mmol) in THF (5 mL) was converted to the carboxylic acid by the same procedure as for **2** (reaction time of 2.5 h) to afford **5a** (0.46 g, 73%), as a white solid; mp = 178–179 °C. $[\alpha]^{25}_D$ 12.2 (c 1.0, MeOH). IR (solid) ν : 3268, 2956, 2095, 1689, 1675, 1582, 1415, 1366, 1258, 1140, 764 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 8.39 (br s, 1H, D₂O exchange, CO₂H), 6.73 and 6.66 (2 m, 1H, D₂O exchange, NH), 4.62–4.59 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4.05–3.95 (2 m, 2H), 3.70–3.63 (2 m, 1H), 3.48–3.44 (m, 2H), 2.45–2.32 (m, 1H), 2.29–2.23 (m, 1H), 1.67–1.60 (m, 3H), 1.57–1.48 (m, 1H), 1.43 and 1.39 (2 s, 9H, 3 CH₃), 1.27–1.17 (m, 1H), 0.90–0.93 (m, 6H, 2 CH_{3Leu}). ¹³C NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 175.29 (C), 171.78 (C), 154.62 (C), 81.92 (C), 65.39 and 65.17 (CH), 57.68 and 57.41 (CH), 53.84 and 52.16 (CH₂), 50.52 (CH), 41.45 (CH₂), 31.83 and 30.74 (CH₂), 28.23 and 28.07 (CH), 26.84 (CH₂), 24.79 (CH), 22.81 (3 CH₃), 21.71 and 21.45 (2 CH₃). ESI-TOF MS, m/z (%): 461.2 [(M + Na)⁺, 100].

Methyl D-[(3S,5R)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(tert-butoxycarbonyl)]prolyl-L-leucylglycinate (6a). Reaction of the dipeptide acid **5a** (0.42 g, 0.96 mmol) in dry CH₃CN and glycine methyl ester hydrochloride (0.14 g, 1.15 mmol) carried out by the same procedure as for dipeptides **4**; reaction time 20 h at room temperature. Purification by flash column chromatography with hexane/EtOAc 1:3 as eluent afforded, after concentration, **6a** (0.40 g, 82 %) as a white solid; mp = 158–159 °C. $[\alpha]^{25}_D$ 42.6 (c 1.04, MeOH). IR (solid) ν : 3234, 2954, 2925, 2099, 1753, 1698, 1639, 1551, 1448, 1365, 1279, 1202, 1176, 1135, 988, 781 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 7.84 and 6.73 (2 br s, 1H, D₂O exchange, NH), 6.19 (d, J = 8.5 Hz, 1 H D₂O exchange, NH), 4.51 (ddd, J = 10.1,

5.8, 4.2 Hz, 1H, 2-H_{Leu}), 4.23–4.06 (m, 1H, 2-H_{Pro}), 4.12–4.08 (m, 1H, CHH_{Gly}), 3.93–3.91 (m, 1H, CHH_{Gly}), 3.79–3.72 (m, 1H), 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.47–3.38 (m, 3H), 2.58–2.51 (m, 1H), 2.41–2.32 (m, 1H), 1.98–1.91 (m, 1H), 1.76–1.49 (m, 4H), 1.43 and 1.37 [2 s, 9H 3 CH₃], 0.93 (dd, $J = 9.7$, 6.5 Hz, 6H, 2 CH₃-Leu). ¹³C NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 172.25 (C), 171.41 (C), 170.28 (C), 154.32 (C), 81.91 (C), 66.03 (CH), 57.65 (CH), 53.53 (CH₂), 53.27 (CH₂), 52.09 (CH₃), 51.84 (CH), 41.11 (CH₂), 40.97 (CH), 39.83 (CH₂), 32.20 (CH₂), 28.32 (3 CH₃), 24.97 (CH), 23.27 and 21.07 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, m/z : 532.2582 [M + Na]⁺, (C₁₆H₂₈N₉O₄ + Na) requires 532.2608.

D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-leucylglycine (7a). Methyl ester **6a** (130 mg, 0.26 mmol) in THF was converted to carboxylic acid **7a** by the same procedure as for **2** (reaction time of 5 h) to afford **7a** (110 mg, 87%) as a white solid; mp = 57–60 °C. [α]_D²⁵ –34.26 (*c* 1.05, MeOH). IR (solid) ν : 3309, 2959, 2099, 1748, 1647, 1534, 1393, 1367, 1255, 1167, 1142, cm⁻¹. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : [9.99 (d, $J = 8.4$ Hz), 9.71–9.59 (m), 9.37–9.37 (m), 9.28 (d, $J = 8.5$ Hz), 9.14 (t, $J = 5.6$ Hz), 8.92 (t, $J = 5.7$ Hz), 7.70 (d, $J = 8.3$ Hz), 2H, D₂O exchange, 2 NH], 9.59 (br s, 1H D₂O exchange, CO₂H), [5.30–5.21 (m), 5.12–5.03 (m), 1H], [4.77–4.58 (m, 1H), 4.54–4.45 (m, 1H), [4.44–4.35 (m), 4.31–4.15 (m), 2H], 4.13–3.97 (m), 3.90–3.74 (m), 3.71–3.65 (m), 3.53–3.42 (m), 4H], [2.88–2.76 (m), 2.68–2.63 (m), 2.49–2.38 (m), 2H], [2.24–2.16 (m), 2.06–1.73 (m), 4H], 1.58 and 1.47 (2 s, 9H, C(CH₃)₃), [0.95–0.84 (m), 0.72 (d, $J = 6.4$ Hz), 0.66 (d, $J = 6.3$ Hz), 6H, 2 CH₃-Leu]. ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : 175.72 and 174.97 (C), 173.56, 173.48, 173.17, 173.14, 173.0 (C), 172.88, 172.85 and 172.27 (C), 159.13, 155.52 and 155.01 (C), 81.59 and 80.78 (C), 66.39, 66.09 and 65.25 (CH), 58.89 and 58.46 (CH), 54.69, 54.6, 54.14, 53.80 and 53.38 (2 CH₂), 53.74, 52.78 and 52.31 (CH), 43.46 and 42.03 (CH), 42.33, 42.27 and 42.21 (CH₂), 41.43 and 40.61 (CH₂), 32.78 and 31.68 (CH₂), 28.58 and 28.55 (3 CH₃), 25.53, 25.35 and 24.85, 23.99, 23.26 and 22.37 (CH), 21.55, and 21.31 (2 CH₃). ESI-TOF MS, m/z (%): 518 [(M + Na)⁺, 100].

D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-leucylglycinamide (8a). Methyl ester **6a** (110 mg, 0.22 mmol) was treated with a concentrated solution of ammonia in MeOH (10 mL) at room temperature. The solution was stirred for 2 h and the solvent and excess ammonia were removed in vacuo. The solid residue was successively dissolved in CH₂Cl₂ (3 x 10 mL) and then evaporated to dryness to afford **8a** (100 mg, 94%) as a white solid; mp = 67–70 °C. [α]_D²⁵ –27.2 (*c* 0.87, MeOH). IR (solid) ν : 3317, 2959, 2098, 1652, 1537, 1391, 1367, 1256, 1167, 1142 cm⁻¹. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : [10.10 (d, $J = 6.9$ Hz), 9.79 (t, $J = 5.6$ Hz), 9.45 (d, $J = 7.2$ Hz) and 8.87 (t, $J = 6.1$ Hz), 2H, D₂O exchange, 2 NH], 8.22, 8.20, 8.13 and 7.89, (4 br s, 2H, D₂O exchange, NH₂), 5.02–4.96 (m, 1H), 4.90–4.84 (m, 1H), 4.57–4.36 (m, 2H), 4.28

(dd, $J = 16.8, 5.5$ Hz, 1H), 4.15–3.99 (m, 1H), 3.83 and 3.44 (2 dd, $J = 12.4, 5.5$ Hz and $J = 12.4, 1.9$ Hz, 1H), 3.68–3.49 (m, 3H), 2.85–2.78 and 2.68–2.66 (2 m, 1H), 2.46–2.31 (m, 1H), 2.16–2.03 (m, 1H), 1.99–1.77 (m, 3H), 1.61 and 1.53 (2 s, 9H, 3 CH₃), [0.96 (dd $J = 5.9$ Hz), 0.91 (d, $J = 5.9$ Hz), 0.87 (d, $J = 5.9$ Hz), 6H, 2 CH₃_{Leu}]. ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : 173.28 and 173.18 (C), 173.08 and 172.88 (C), 172.15 and 172.01 (C), 154.84 and 154.42 (C), 81.34 and 80.39 (C), 65.60 and 65.41 (CH), 58.29 and 57.84 (CH), 54.0, 53.48 and 52.84 (2 CH₂), 53.30 and 52.72 (CH), 43.53 and 43.02 (CH₂), 42.94 and 41.52 (CH), 41.02 and 39.77 (CH₂), 32.08 and 31.04 (CH₂), 28.11 and 28.0 (3 CH₃), 24.98 and 24.78 (CH), 23.10, 22.60, 21.68 and 20.63 (2 CH₃). ESI-TOF MS m/z (%): 517.26 [(M + Na)⁺, 100].

Methyl D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidomethyl)]prolyl-L-leucylglycinate hydrochloride (9a).

Compound **6a** (60 mg, 0.12 mmol) was dissolved in 4 N HCl in dioxane (2 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mass was concentrated and the residue was azeotroped with CH₂Cl₂ to afford **9a** (50 mg, 95%), a low melting white solid. $[\alpha]_D^{25}$ -70.05 (*c* 1.01, MeOH). IR (solid) ν : 3239, 2956, 2101, 1750, 1655, 1551, 1368, 1262, 1207 cm⁻¹. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : [9.87 (d, $J = 7.8$ Hz), 9.75 (d, $J = 7.8$ Hz), 9.64 (br s) and 9.52 (br s), 2H, D₂O exchange, 2 NH], 7.50 (br s, 2H, D₂O exchange, ⁺NH₂), 5.11 (br s, 1H), 4.59–4.57 and 4.52–4.50 (2 m, 1H), 4.36 (dd, $J = 16.8, 5.5$ Hz, 1H), 4.25 (dd, $J = 16.8, 5.1$ Hz, 1H), 4.12–4.01 (m, 1H), 3.97–3.72 (m, 4H), 3.59 and 3.54 (2 s, 3H, CH₃), 2.98–2.93 (m, 1H), 2.36–2.29 (m, 1H), 2.06–1.92 (m, 3H), 1.77–1.69 (m, 1H), 0.90 (d, $J = 3.92$ Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅) δ : 173.12 (C), 170.91 (C), 170.86 (C), 63.57 (CH), 58.73 (CH), 53.62 (CH₂), 53.20 (CH₂), 52.64 (CH₃), 51.77 (CH), 43.92 (CH), 41.61 (CH₂), 41.54 (CH₂), 33.48, (CH₂), 25.21 (CH), 23.27 and 21.59 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, m/z : 410.2259 [M]⁺, (C₁₆H₂₈ClN₉O₄) requires 410.2255.

D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidomethyl)]prolyl-L-leucylglycine hydrochloride (10a).

The same procedure as used to make compound **9a** was used for **7a** (50 mg, 0.10 mmol) to give **10a** (42 mg, 96%) as a low melting beige solid. $[\alpha]_D^{25}$ -38.51 (*c* 1.01, MeOH). IR (solid) ν : 3267, 3055, 2958, 2102, 1716, 1662, 1543, 1407, 1261, 1212, 1036 cm⁻¹. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : [9.98 (d, $J = 7.8$ Hz), 9.51 (br s) and 9.34 (br s), 5H, D₂O exchange, 2 NH, ⁺NH₂, and CO₂H], 5.24–5.11 (m, 1H), [4.80 (d, $J = 6.3$ Hz), 4.50 (dd, $J = 17.2, 5.4$ Hz) and 4.40 (dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz), 2H], 4.33–4.21 (m, 1H), 4.08–3.84 (m, 3H), 3.77–3.43 (m, 1H), 3.06–2.79 (m, 1H), 2.41–2.20 (m, 1H), 2.09–2.02 (m, 2H), 1.89–1.79 (m, 1H), 1.49–1.27 (m, 2H), 0.92 and 0.85–0.83 (br s and m, 6H, 2 CH₃_{Leu}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅) δ : 173.16 (C), 172.89 (C), 170.42 (C), 63.26 (CH), 59.23 (CH), 53.65 (CH₂), 52.95 (CH), 52.76 (CH₂), 43.97 (CH), 42.06 (CH₂), 41.58 (CH₂), 33.38 (CH₂), 25.27

(CH), 23.33 and 21.61 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, *m/z*: 396.2108 [M]⁺, (C₁₅H₂₆N₉O₄) requires 396.2103.

D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidomethyl)]prolyl-L-leucylglycinamide hydrochloride (11a). The same procedure as used to make compound **9a** was used on **8a** (40 mg, 0.08 mmol) to give **11a** (34 mg, 98%) as a pale yellow low melting solid. [α]²⁵_D −30.95 (*c* 1.05, MeOH). IR (solid) *v*: 3273, 2958, 2102, 1660, 1655, 1548, 1539, 1262, 1031 cm^{−1}. ¹H NMR (pyridine-*d*₅ rotamers present) δ: 10.02–10.0 (m, 1H, D₂O exchange, NH), 9.63–9.59 (m, 1H, D₂O exchange, NH), 8.38, 8.31 and 8.10 (3 br s, 4H, D₂O exchange, NH₂ + ⁺NH₂), 5.03–5.0 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 2-H_{Pro}), 4.39 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, 2-H_{2Gly}), 4.26–4.19 (m, 1H), 4.08–3.85 (m, 4H), 3.82–3.67 (m, 1H), 3.05–2.94 (m, 1H, 4-HH_{Pro}), 2.44–2.37 (m, 1H, 4-HH_{Pro}), 2.13–1.96 (m, 2H, 3-H_{2Leu}), 1.93–1.78 (m, 1H, 4-H_{Leu}), 0.99–0.86 (m, 6H, 2 CH_{3Leu}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅) δ: 173.18 (C), 172.92 (C), 170.79 (C), 63.21 (CH), 59.35 (CH), 53.57 (CH₂), 53.33 (CH), 52.62 (CH₂), 43.96 (CH), 43.55 (CH₂), 41.23 (CH₂), 33.34 (CH₂), 25.29 (CH), 23.31 and 21.59 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, *m/z*: [M]⁺, (C₁₅H₂₇ClN₁₀O₃) 395.2273, requires 395.2263.

L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-leucine (5b). Methyl ester **4b** (0.23 g, 0.51 mmol) in THF (2 mL) was converted to the carboxylic acid by the same procedure as used to make **2** (reaction time of 3.5 h) to afford **5b** (0.20 g, 90%) as a white solid; mp = 47–49 °C. [α]²⁵_D +11.3 (*c* 1.0, MeOH). IR (solid) *v*: 3314, 2961, 2100, 1731, 1686, 1665, 1542, 1388, 1367, 1256, 1138, 855 cm^{−1}. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ: 9.54 and 9.30 (2 d, *J* = 7.9 Hz and *J* = 7.3 Hz, 1H, D₂O exchange NH), 5.21–5.19 and 5.17–5.14 (2 m, 1H), 4.73–4.70 and 4.63–4.60 (2 m, 1H), 4.49–4.46 and 4.37–4.33 (2 m, 1H), 4.16 (dd, *J* = 12.2, 5.8, Hz, 1H), 3.78–3.70, 3.65–3.57 and 3.51–3.54 (3 m, the first two are simplified with D₂O to dd centered at 3.93, *J* = 12.1, 5.5 Hz, 3H), 2.91–2.85 (m, 1H), 2.58–2.51 (m), [2.40 (dt, *J* = 13.2, 8.3 Hz) and 2.21–2.19 (m), 2H, one of them D₂O exchange, CO₂H], 2.09–2.0 (m, 2H), 1.91–1.81 (m, 2H), 1.68 and 1.60 (2 s, 9H, 3 CH₃), 1.08–1.05 (m, simplified with D₂O to dd centered at 0.98, *J* = 6.2 Hz), 0.93 and 0.89 (2 d, *J* = 5.4 Hz and *J* = 5.9 Hz), 6H, 2 CH_{3Leu}]. ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ: 176.54 (C), 173.03 (C), 155.31 (C), 80.32 (C), 65.52 (CH), 54.58 and 54.07 (CH₂), 53.12 (CH₂), 52.32 (CH), 42.90 (CH), 41.52 (CH₂), 32.25 and 31.15 (CH₂), 28.45 (3 CH₃), 25.31 (CH), 23.19 and 21.80 (2 CH₃). ESI-TOF MS, *m/z* (%): 461.2 [(M + Na)⁺, 100].

Methyl L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-leucylglycinate (6b). The reaction of dipeptide acid **5b** (150 mg, 0.34 mmol) and glycine methyl ester hydrochloride (51.5 mg, 0.41 mmol) was carried out by the same procedure as for the tripeptide **6a**, using dry CH₃CN (10 mL) as solvent, reaction time 17 h at room temperature. Purification by flash column

chromatography with hexane/EtOAc 1:3 as eluent afforded, after concentration, **5b** (150 mg, 86 %) as a white solid; mp = 119–120 °C. $[\alpha]_D^{25}$ -17.0 (*c* 0.99, MeOH). IR (solid) ν : 3278, 2960, 2928, 2099, 1748, 1702, 1645, 1548, 1448, 1366, 1255, 1207, 1175, 1138, 776 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , rotamers present) δ : 6.91 and 6.70 (2 br s, 1H, NH, D_2O exchange), 6.37 and 6.13 (2 d, J = 6.8 Hz, 1H, NH, D_2O exchange), 4.47–4.42 (m, 1H), 4.11–3.89 (m, 5H), 3.72 (s, 3H, CH_3), 3.52–3.39 (m, 3H), 2.44–2.25 and 2.28–2.24 (2 m, 2H), 1.76–1.70 (m, 2H), 1.64–1.53 (m, 2H), 1.41 and 1.46 (2 s, 9H, 3 CH_3), 0.94 (s, 6H, 2 CH_3 _{Leu}). ^{13}C NMR (CDCl_3 , rotamers present) δ : 172.14 and 172.07 (C), 171.86 (C), 169.93 (C), 154.32 (C), 81.65 and 80.87 (C), 65.42 and 65.05 (CH), 57.83 and 57.31 (CH), 54.16 and 53.80 (CH_2), 52.46 (CH_2), 52.27 (CH), 51.82 and 51.51 (CH_3), 41.96 and 40.73 (CH), 41.04 and 40.38 (CH_2), 32.14 (CH_2), 30.72 (CH_2), 28.15 [$(\text{CH}_3)_3$], 24.64 (CH), 23.0, 22.72, 21.63, and 21.18, (2 CH_3). ESI-TOF MS, m/z (%): 532.3 $[(\text{M} + \text{Na})^+]$, 100].

Ethyl L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidomethyl)prolyl-L-leucylglycinate (6b'). Methyl ester **6b** (80 mg, 0.16 mmol) in THF (1 mL) was treated under similar conditions to those used to make **2**, except that in the work-up process the pH was below 4, to afford a yellowish oil (70 mg), which was purified by flash column chromatography with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1 as eluent to afford, after concentration, **6b'** (50 mg, 81 %) as a viscous yellowish oil. $[\alpha]_D^{25}$ +6.14 (*c* 1.0, MeOH). IR (film) ν : 3298, 3063, 2960, 2107, 1713, 1664, 1548, 1411, 1207, 1175, 1161, 1039, 1011, 863, 767 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : 9.64 (d, J = 8.3 Hz, 1H, D_2O exchange, NH), 9.49 (t, J = 5.6 Hz, 1H, D_2O exchange, NH), 5.22–5.16 (m, 1H, 2- H_{Leu}), 4.68–4.54 (m, 3H), 4.45–4.40 (m, 1H), 4.17–4.12, 4.07–4.0, 3.99–3.89 and 3.82–3.78 (4 m, 6H, one of them D_2O exchange, NH), 3.15–3.09 and 3.02–2.94 (2 m, 1H), 2.37–2.31 (m, 1H), 2.05–1.87 and 1.81–1.78 (2 m, 4H), 1.37 and 1.12 (2 t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.89–0.86 (m, 1H), 0.82 (dd, J = 14.2, 6.4 Hz respectively, 6H, 2 CH_3 _{Leu}). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 173.36 (C), 172.90 (C), 171.32 (C), 63.36 (CH), 63.23 (CH_2), 59.44 (CH), 53.72 (CH_2), 53.50 (CH_2), 52.57 (CH), 44.83 (CH), 42.06 (CH_2), 41.73 (CH_2), 34.18 (CH_2), 25.04 (CH), 23.14 (CH_3), 21.81 (CH_3), 15.69 (CH_3). ESI-TOF MS, m/z (%): 424.18 $[(\text{M} + 1)^+]$, 27], 410.19 (100).

L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)prolyl-L-leucylglycinamide (8b). Methyl ester **6b** (60 mg, 0.12 mmol) in dry MeOH (5 mL) was converted to carboxamide **8b** by the same procedure as used to make **8a** to afford **8b** (56 mg, 97%) as a white solid; mp = 60–62 °C. $[\alpha]_D^{25}$ +12.6 (*c* 1.02, MeOH). IR (solid) ν : 3297, 2957, 2929, 2100, 1652, 1539, 1450, 1366, 1255, 1138, 776 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : [9.72 (d, J = 6.3 Hz), and 9.37 (br s), 2H, D_2O exchange, 2 NH], 8.24 and 8.19 (2 br s, 2H, D_2O exchange, NH_2), 4.97–4.93 (m, 1H, NHCH_{Leu}), 4.63–4.51 (m, 2H CH_2Gly), 4.35–4.21 (m, 2H), 4.07 and 3.73 (2 dd, J = 12.5, 5.5 Hz and

$J = 11.7, 6.3$ Hz, 1H), 3.58–3.51 (m, 3H), 2.76–2.71 (m, 1H), 2.49–2.46 and 2.25 (m and dt, $J = 13.3, 7.8$ Hz, 1H), 2.0–1.90 (m, 3H), 1.86–1.74 (m, 1H), 1.59 and 1.54 (2 s, 9H 3 CH₃), 0.87–0.78 (m, 6H, 2 CH₃_{Leu}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : 174.04 (C), 173.98 and 173.68 (C), 172.49 (C), 155.07 (C), 88.82 and 80.35 (C), 65.71 and 65.08 (CH), 58.76 and 58.15 (CH), 54.43, 53.80, 53.51 and 52.98 (2 CH₂), 53.67 (CH), 43.52 (CH₂), 42.84 and 41.86 (CH), 40.93 and 40.68 (CH₂), 31.19 and 31.06 (CH₂), 28.42 (3 CH₃), 25.02 (CH), 23.11, 22.87, 22.03 and 21.85 (2 CH₃). ESI-TOF MS, m/z (%): 517.26 [(M + Na)⁺, 100].

Methyl L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidomethyl)]prolyl-L-leucylglycinate hydrochloride (9b). The same procedure as used to make compound **9a** was used on **6b** (40 mg, 0.08 mmol) to give **9b** (34 mg, 97%) as a white low melting solid. $[\alpha]_D^{25} +10.76$ (*c* 1.05, MeOH). IR (solid) ν : 3206, 2956, 2102, 1749, 1656, 1543, 1368, 1262, 1206 cm⁻¹. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : 9.90 (d, $J = 7.8$ Hz) and 9.64 (br s, 2H, D₂O exchange, 2 NH), 9.05 (br s, 2H, D₂O exchange, ⁺NH₂), 5.10–5.07 (m, 1H), 4.70 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.42 (dd, $J = 17.3, 5.4$ Hz, 1H), 4.22 (dd, $J = 17.2, 5.5$ Hz, 1H), 4.11–4.09 (m, 2H), 4.0 (dd, $J = 11.7, 5.5$ Hz, 1H), 3.84 (dd, $J = 19.9, 7.2$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J = 23.4, 7.8$ Hz, 1H), 3.58 (s, 3H, CH₃), 3.02–2.95 (m, 1H), 2.35–2.30 (m, 1H), 1.91–1.78 (m, 4H), [0.93–0.86 (m) and 0.74 (dd, $J = 13.3, 6.1$ Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu})]. ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : 173.45 (C), 170.97 (C), 170.44 (C), 62.83 (CH), 59.78 (CH), 53.43 (CH₂), 52.83 (CH₂), 52.63 (CH₃), 51.89 (CH), 44.54 (CH), 41.59 (CH₂), 41.50 (CH₂), 33.71, (CH₂), 24.99 (CH), 23.05 and 21.77 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, m/z : [M]⁺, (C₁₆H₂₈N₉O₄) 410.2262, requires 410.2259.

L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidomethyl)]prolyl-L-leucylglycinamide hydrochloride (11b). The same procedure as used to make compound **11a** was used on **8b** (40 mg, 0.08 mmol) to give **11b** (33 mg, 95%) as a low melting beige solid. $[\alpha]_D^{25} +23.84$ (*c* 0.99, MeOH). IR (solid) ν : 3271, 2927, 2104, 1656, 1654, 1543, 1261 cm⁻¹. ¹H NMR (pyridine-*d*₅) δ : 9.86 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, D₂O exchange, NH), 9.58 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, D₂O exchange, NH), 8.41 and 8.19 (2 br s, 2H, D₂O exchange, ⁺NH₂), 7.10 (br s, 2H, D₂O exchange, NH₂), 5.05–4.99 (m, 1H, 2-H_{Leu}), 4.65 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 2-H_{Pro}), 4.46 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, 2-H_{2Gly}), 4.09–3.96 (m, 3H), 3.85–3.71 (m, 2H), 3.03–2.96 (m, 1H), 2.34–2.27 (m, 1H), 1.97–1.72 (m, 2H), 1.84–1.72 (m, 2H), 0.77 (dd, $J = 10.1, 7.0$ Hz, 6H, 2 CH₃_{Leu}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅) δ : 173.27 (C), 172.37 (C), 172.24 (C), 62.88 (CH), 59.67 (CH), 53.54 (CH₂), 53.19 (CH), 53.05 (CH₂), 44.51 (CH), 43.38 (CH₂), 41.34 (CH₂), 33.73 (CH₂), 25.06 (CH), 23.07 and 21.82 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, m/z : [M]⁺, (C₁₅H₂₇N₁₀O₃) 395.2262, requires 395.2263.

Methyl D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valinate (12a) and methyl L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valinate (12b). Carboxylic acid **2** (0.72 g, 2.21 mmol) was converted to the dipeptides **12** by the same procedure as

used to make **4**. The crude product was purified by flash column chromatography with hexane/EtOAc 7:1 as eluent to afford the corresponding dipeptides. Compound **12a** (0.40 g, 41%) eluted first, followed by a mixture of **12a** + **12b** (0.15 g, 15%) and finally **12b** (0.37 g, 36%).

Compound **12a**: white solid, mp = 87–89 °C. $[\alpha]_D^{25}$ –15.5 (*c* 1.05, MeOH). IR (solid) ν : 3265, 2971, 2097, 1744, 1704, 1655, 1547, 1383, 1258, 1197, 1140, 996, 787 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , rotamers present) δ : 6.61 and 6.36 (2 br s, 1H, NH), 4.59–4.51 (m, 1H), 4.19–4.06 (m, 1H), 4.05–3.90 (m, 2H), 3.73 (s, 3H, CH_3), 3.58–3.40 (m, 3H), 2.40–2.21 (m, 2H), 2.15 (ddd, J = 13.8, 7.0, 5.0 Hz, 1H), 1.70–1.54 (m, 1H), 1.39 (s, 9H, 3 CH_3), 0.95–0.90 (m, 6H, 2 CH_3 val). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 172.46 (C), 171.62 (C), 154.13 (C), 81.60 (C), 65.54 (CH), 57.88 (CH), 56.95 (CH), 54.24 (CH_2), 52.43 (CH_2), 52.17 (CH_3), 42.51 (CH), 31.63 (CH_2), 31.54 (CH), 28.15 (3 CH_3), 18.94 and 17.76 (2 CH_3). ESI-TOF MS, m/z (%): 461.2 [(M + Na) $^+$, 100].

X-ray Crystallography of 12a. Single colorless crystals of **12a** suitable for X-ray diffractometry were obtained by iterative recrystallization of the isolated product using ether/isooctane. The desired single crystals were mounted in an inert oil and transferred to the cold gas stream of the diffractometer. Empirical formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_5$; formula weight: 438.5; crystal size: 0.44 × 0.34 × 0.09 mm; crystal color: colorless; habit: prismatic; crystal system: orthorhombic, space group $P2_12_12_1$; lattice parameters: a = 9.5219 (11) Å, b = 12.5035 (16) Å, c = 19.300 (5) Å; at 100 K, V = 2297.7 (5) Å 3 , and Z = 4 { D calcd = 1.268 Mg m^{-3} , μ = 0.10 mm^{-1} }.

Compound **12b**: white solid, mp = 50–52 °C. $[\alpha]_D^{25}$ +4.0 (*c* 1, MeOH). IR (solid) ν : 3299, 2961, 2096, 1741, 1688, 1651, 1540, 1408, 1366, 1260, 1205, 1137, 1136, 100, 5790 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , rotamers present) δ : 6.40 and 6.07 (br s and d, J = 6.8 Hz, 1H, D_2O exchange, NH), 4.44–4.41 (m, 1H, 2-H), 4.10–3.98 and 3.59–3.50 (2 m, 3H), 3.70 (s, 3H, CH_3), 3.49–3.38 (m, 3H), 2.45–2.22 (m, 2H), 2.16–2.15 (m, 1H), 1.70–1.57 (m, 1H), 1.44 and 1.38 (2 s, 9H), (3 CH_3), 0.92 and 0.88 (2d, J = 7.3 Hz, and J = 6.3 Hz, 6H, 2 CH_3 val). ^{13}C NMR (CDCl_3 , rotamers present) δ : 172.12 (C), 171.88 and 171.24 (C), 154.20 (C), 81.33 and 80.89 (C), 65.14 (CH), 57.79 and 57.38 (CH), 54.30 and 53.92 (CH_2), 52.46 (CH_2), 52.13 (CH_3), 41.95 (CH), 40.32 (CH), 31.96 and 30.68 (CH_2), 31.24 and 30.87 (CH), 28.15 (3 CH_3), 19.02 and 17.81 (2 CH_3). CI MS m/z (%): 383 [(M – CO_2Me , 4%), 382 (1%), 340 (23), 339 (100), 296 (13), 283 (15), 282 (53), 268 (15), 180 (641), 130 (11), 109 (12), 80 (10), 68 (21), 57 (60), 56 (15)].

D-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valine (13a**).** Methyl ester **12a** (0.50 g, 1.14 mmol) in THF (10 mL) was converted to the carboxylic acid by the same procedure as used to make **2** to afford, after 5 h of reaction, **13a** (0.48 g, 99%) as a white solid; mp = 188–189

$^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -7.2$ (c 1, MeOH). IR (solid) ν : 3302, 2967, 2097, 1670, 1627, 1526, 1401, 1367, 1256, 1142 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine- d_5 , rotamers) δ : 8.90 and 8.05 (2 br s, 1H, D_2O exchange, CO_2H), 6.15 (br s, 1H D_2O exchange, NH), 4.91–4.89 (m, 1H), 4.74–4.70, 4.51–4.48, 4.44–4.40 and 4.30–4.25 (4 m, 2H), 4.12 and 3.80–3.87 (dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz and m, 2H), 3.64–3.59 (m, 2H), 2.79–2.60 (m, 2H), 2.58–2.50 and 2.43–2.36 (2 m, 1H), 1.91–1.61 (m, 1H), 1.55 and 1.53 (2 s, 9H 3 CH_3), 1.17 (apparent t, $J = 6.8$ Hz, 6H, 2 $\text{CH}_{3\text{Val}}$). ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , rotamers present) δ : 176.32 (C), 172.24 (C), 155.12 (C), 81.40 and 80.46 (C), 66.26 and 65.93 (CH), 60.11 (CH), 58.60 and 58.20 (CH), 54.42 and 54.24 (CH_2), 53.07 (CH_2), 43.37 (CH), 32.52 and 32.34 (CH), 31.44 (CH_2), 28.49 (3 CH_3), 20.47, 20.24, 18.64 and 18.37 (2 CH_3). ESI-TOF MS, m/z (%): 447.2 $[(\text{M} + \text{Na})^+]$, 100].

Methyl D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valylglycinate (14a**).**

The reaction of dipeptide acid **13a** (0.20 g, 0.47 mmol) and glycine methyl ester hydrochloride (0.07 g, 0.57 mmol) was carried out by the same procedure as used to make the tripeptide **6a**, in dry CH_3CN (12 mL) as solvent; reaction time 17 h at room temperature. Purification by flash column chromatography with hexane/EtOAc 1:3 as eluent afforded, after concentration, **14a** (0.18 mg, 77 %) as a white solid; mp = 164–166 $^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -40.5$ (c 1.05, MeOH). IR (solid, rotamers present) ν : 3332, 3225, 2958, 2936, 2106, 2092, 1764, 1752, 1693, 1681, 1640, 1557, 1438, 1391, 1363, 1204, 1178, 774 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine- d_5 , rotamers present) δ : 9.95 and 8.99 (2 br s, 1H, D_2O exchange, NH), 9.38 and 9.23 (2 d, $J = 8.8$ Hz and $J = 8.4$ Hz respectively, 1H, D_2O exchange, NH), 5.05–4.92 (m, 2H), 4.64–4.58, 4.51–4.45, 4.42–4.40, 4.26–4.16 and 4.13–4.12 (5 m, 4H), 4.05 and 3.79 (2 dd, $J = 12.2, 6.4$ Hz and $J = 12.2, 5.4$ Hz respectively, 1H), 3.72–3.67, 3.62–3.57 and 2.86–2.79 (3 m, 3H), 3.65 and 3.62 (2 s, 3H, CO_2CH_3), 2.70–2.64 and 2.52–2.35 (2 m, 2H), 1.89–1.77 (m, 1H), 1.60 and 1.49 (2 s, 9H, 3 CH_3), 1.20, 1.16 and 1.13 (3 d, $J = 6.9$ Hz, $J = 2.4$ Hz $J = 6.8$ Hz respectively, 6H, 2 $\text{CH}_{3\text{Val}}$). ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , rotamers present) δ : 173.08 and 172.85 (C), 172.63 and 172.37 (C), 170.93 (C), 155.44 (C), 81.33 and 80.53 (C), 65.84 (CH), 59.23 and 59.09 (CH), 58.80 and 58.21 (CH), 54.51 and 53.96 (CH_2), 53.54 and 53.31 (CH_2), 51.87 and 51.80 (CH_3), 43.38 and 41.90 (CH), 41.74 and 41.44 (CH_2), 32.46 (CH_2), 31.76 and 29.82 (CH), 28.34 (3 CH_3), 19.86, 19.74, 19.15, and 17.82 (2 CH_3). ESI-TOF MS, m/z (%): 518.2 $[(\text{M} + \text{Na})^+]$, 100].

D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valylglycine (15a**).**

Methyl ester **14a** (100 mg, 0.20 mmol) was converted to the carboxylic acid by the same procedure as used to make **2** (reaction time 24 h) to afford **15a** (90 g, 93%) as a white solid; mp = 136–138 $^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -31.25$ (c 0.99, MeOH). IR (solid) ν : 3315, 2972, 2933, 2106, 2099, 1662, 1609, 1526, 1403, 1367, 1256, 1166, 1143, 775 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine- d_5 , rotamers present) δ : [11.40–10.93 (3 m), 9.46–8.56 (5 m), 3H, D_2O exchange, CO_2H and 2 NH], 5.08–4.09 (m, 5H), 3.91–3.56 (m, 4H), 2.84–2.40

(m, 3H), 2.03–1.71 (m, 1H), 1.66–1.53 (m, 9H C(CH₃)₃), 1.48–1.33 and 1.29–1.16 (2 m, 6H, 2 CH₃_{Lcu}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ: 174.13 (C), 173.10 (C), 171.89 (C), 155.37 and 155.37 (C), 82.30 and 80.58 (C), 65.84 (CH), 59.56 (CH), 58.79 (CH), 54.51 and 54.32 (CH₂), 53.31 (CH₂), 43.97 and 43.89 (CH₂), 43.38 (CH), 31.56 (CH₂), 30.31 (CH), 28.54, 28.35, 28.07 and 27.92 (3 CH₃), 19.89 and 19.18 (2 CH₃). ESI-TOF MS, *m/z* (%): 504.2 [(M + Na)⁺, 88], 488.2 (65), 448.2 (38), 382.2 (100).

D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valylglycinamide (16a).

Methyl ester **14a** (150 mg, 0.22 mmol) was treated with a concentrated solution of ammonia in MeOH (15 mL) using the same procedure as used to make **8a**, to afford **16a** (144 mg, 99%) as a white solid; mp = 186–188 °C. [α]²⁵_D –27.1 (*c* 1, MeOH). IR (solid) ν: 3291, 3205, 2967, 2101, 1678, 1640, 1624, 1536, 1393, 1366, 1275, 1227, 1171, 1142 cm^{–1}. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ: [9.83 (t, *J* = 5.3 Hz), 9.60 (d, *J* = 7.4 Hz), 9.31 (d, *J* = 7.8 Hz) and 8.95 (t, *J* = 5.8 Hz), 2H, D₂O exchange, 2 NH], 8.32, 8.24, 8.14 and 7.94 (4 br s, 2H, D₂O exchange, NH₂), 4.86–4.81 (m), 4.63–4.55 (m, 2H), 4.49–4.46 and 4.42 (m and dd, *J* = 16.6, 5.4 Hz, 1H), 4.32 and 3.84 (2 dd, *J* = 17.1, 5.4 Hz and *J* = 12.2, 5.3 Hz, 1H), 4.17–4.14 and 4.09 (m and dd, *J* = 12.2, 5.9 Hz, 1H), 3.74–3.52 and 3.45 (m and d, *J* = 12.3 Hz, 3H), 2.86–2.68 and 2.52–2.38 (2 m, 3H), 1.89–1.76 (m, 1H), 1.62 and 1.56 (2 s, 9H, 3 CH₃), 1.21–1.16 (m, 6H, 2 CH₃_{Val}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ: 173.76 and 173.49 (C), 172.54 and 172.48 (C), 172.21 and 172.16 (C), 155.31 and 154.68 (C), 81.54 and 80.64 (C), 65.74 and 65.65 (CH), 60.53 and 60.27 (CH), 58.74 and 58.12 (CH), 54.45 and 53.87 (CH₂), 53.33 and 53.27 (CH₂), 43.77 and 43.17 (CH₂), 43.35 and 41.85 (CH), 32.4 and 31.44 (CH₂), 31.23 and 29.65 (CH), 28.45 and 28.36 (3 CH₃), 19.86, 19.74, 19.38 and 18.12 (2 CH₃). ESI-TOF MS, *m/z* (%): 503.2 [(M + Na)⁺, 100].

Methyl D-[(3*S*,5*R*)-3,5-bis(azidomethyl)]prolyl-L-valylglycinate hydrochloride (17a). The same procedure as used to make compound **9a** was used on **14a** (60 mg, 0.12 mmol) to give **17a** (40 mg, 76 %) as a low melting beige solid. [α]²⁵_D –33.83 (*c* 1.15, MeOH). IR (solid) ν: 3269, 2962, 2101, 1749, 1653, 1543, 1371, 1261, 1206, 1182 cm^{–1}. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ: 9.68 (br s), 9.34 (d, *J* = 7.6 Hz) and 8.17 (br s), 4H, D₂O exchange, 2 NH, ⁺NH₂), 4.97–4.93 (m, 1H, 2-*HH*_{Val}), 4.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 2-*HH*_{Val}), 4.38 (dd, *J* = 17.3, 6.2 Hz, 1H, *CHH*_{Gly}), 4.18 (dd, *J* = 17.3, 5.1 Hz, 1H, *CHH*_{Gly}), 3.92–3.63 (m, 5H), 3.59 and 3.55 (2 s, 3H, CH₃), 2.92–2.85 (m, 1H), 2.59–2.48 (m, 1H), 2.28–2.21 (m, 1H), 1.69–1.59 (m, 1H), 1.16 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, 2 CH₃_{Val}). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 171.76 (C), 170.78 (C), 168.45 (C), 61.74 (CH), 60.46 (CH), 59.05 (CH), 52.79 (CH₂), 52.50 (CH₃), 50.67 (CH₂), 43.54 (CH), 40.91 (CH₂), 32.66 (CH₂), 31.38 (CH), 19.15 and 17.89 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, *m/z*: 396.2109 [M]⁺, (C₁₅H₂₆N₉O₄) requires 396.2103.

D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidomethyl)]prolyl-L-valylglycine hydrochloride (18a). The same procedure as used to make compound **9a** was used on **15a** (60 mg, 0.12 mmol) to give **18a** (48 mg, 92 %) as a low melting beige solid. $[\alpha]_D^{25} -24.21$ (*c* 0.95, MeOH). IR (solid) ν : 3251, 2966, 2103, 1722, 1655, 1543, 1395, 1261, 1116, 1036, 928 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine-*d*₅) δ : 9.70 (br s, 2H, D₂O exchange, 2 NH), 9.10 (br s, 3H, D₂O exchange, $^+\text{NH}_2$, CO₂H), 5.0 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, 2-H_{Val}), 4.76 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.57–4.46 (m, 1H), 4.41–4.31 (m, 1H), 4.06–3.99 (m, 2H), 3.94–3.87 (m, 1H), 3.85–3.76 (m, 2H), 2.94–2.91 (m, 1H), 2.64–2.58 (m, 1H), 2.33–2.27 (m, 1H), 1.77–1.69 (m, 1H), 1.26–1.18 (m, 6H, 2 CH_{3Val}). ^{13}C NMR (pyridine-*d*₅) δ : 178.10 (C), 172.41 (C), 171.53 (C), 63.11 (CH₂), 59.76 (CH), 59.06 (CH), 54.06 (CH₂), 53.22 (CH₂), 44.23 (CH), 42.23 (CH₂), 33.78 (CH₂), 31.44 (CH), 19.75 and 18.68 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, *m/z*: $[\text{M}]^+$, (C₁₄H₂₄N₉O₄) 382.1953, requires 382.1946.

D-[(3*S*,5*R*)-3,5-Bis(azidomethyl)]prolyl-L-valylglycinamide hydrochloride (19a). The same procedure as used to make compound **9a** was used on **16a** (60 mg, 0.12 mmol) to give **19a** (48 mg, 92 %) as a low melting beige solid. $[\alpha]_D^{25} -19.58$ (*c* 0.94, MeOH). IR (solid) ν : 3248, 2965, 2101, 1681, 1659, 1630, 1539, 1373, 1257, 1118, 873 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine-*d*₅) δ : [9.64–9.57 (m), 8.66 (br s), 8.41 (br s), and 8.12 (br s), 6H, D₂O exchange, 2 NH, NH₂ and $^+\text{NH}_2$], 4.92–4.88 (m, 1H, 2-H_{Val}), 4.85–4.81 (m, 1H, 2-H_{Pro}), 4.48 and 4.40 (AB part, AB system, *J* = 16.4, 6.3, 5.5 Hz, 2H, 2-H_{2Gly}), 4.14–4.04 (m, 1H), 4.04–3.96 (m, 2H), 3.90–3.80 (m, 2H), 2.97–2.89 (m, 1H), 2.57–2.50 (m, 1H), 2.39–2.32 (m, 1H), 1.85–1.77 (m, 1H), 1.19–1.15 (m, 6H, 2 CH_{3Val}). ^{13}C NMR (pyridine-*d*₅) δ : 172.48 (C), 172.11 (C), 171.39 (C), 62.92 (CH), 59.97 (CH), 59.37 (CH), 53.90 (CH₂), 52.83 (CH₂), 44.22 (CH), 43.41 (CH₂), 33.61 (CH₂), 31.28 (CH), 19.76 and 18.65 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, *m/z*: $[\text{M}]^+$, (C₁₄H₂₅N₁₀O₃) 381.2107, requires 381.2106.

L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valine (13b). Methyl ester **12b** (0.40 g, 0.91 mmol) in THF (10 mL) was converted to the carboxylic acid by the same procedure as used to make **2**, to afford **13b** (0.37 g, 96 %) as a white solid; mp = 64–66 °C. $[\alpha]_D^{25} -9.4$ (*c* 1.0, MeOH). IR (solid) ν : 3318, 2933, 2099, 1663, 1527, 1391, 1366, 1256, 1167, 1137 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 8.05 (br s, 1H, D₂O exchange, CO₂H), 6.78 and 6.45 (2 br s, 1H, D₂O exchange, NH), 4.37–4.30 (m, 1H), 4.15–3.95 and 3.65–3.59 (2 m, 3H), 3.51–3.36 (m, 3H), 2.52–2.39 and 2.30–2.14 (2 m, 3H), 1.76–1.59 (m, 1H), 1.44, 1.40 and 1.38 (3 s, 9H, 3 CH₃), 0.92 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H, 2 CH_{3Val}). ^{13}C NMR (CDCl₃, rotamers present) δ : 176.47 and 176.31 (C), 172.59 and 171.61 (C), 154.40 (C), 81.80 and 81.09 (C), 65.12 (CH), 58.80 and 58.67 (CH), 57.83 and 57.24 (CH), 54.13 and 53.81 (CH₂), 52.46 (CH₂), 41.96 and 40.33 (CH), 32.01 and 30.64

(CH₂), 31.11 (CH), 28.20 (3 CH₃), 19.31, 17.94 and 17.59 (2 CH₃). ESI-TOF MS, *m/z* (%): 447.2 [(M + Na)⁺, 100].

Methyl L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valylglycinate (14b**).**

The reaction of dipeptide acid **13b** (0.37 g, 0.87 mmol) and glycine methyl ester hydrochloride (0.13 g, 1.05 mmol) was carried out by the same procedure as used to make the tripeptide **6a**, using dry CH₃CN (40 mL) as solvent; reaction time 15 h at room temperature. Purification by flash column chromatography with hexane/EtOAc 1:3 as eluent afforded, after concentration, **14b** (0.33 g, 76 %) as a white solid; mp = 101–103 °C. [α]_D²⁵ −9.3 (*c* 0.99, MeOH). IR (solid) ν: 3286, 2966, 2928, 2097, 1753, 1698, 1644, 1540, 1449, 1366, 1255, 1204, 1173, 1134, 776 cm^{−1}. ¹H NMR (CDCl₃, rotamers present) δ: 7.05 (br s, 1H, NH, D₂O exchange), 6.61 and 6.46 (2 d, *J* = 7.8 Hz and *J* = 7.4 Hz, 1H, D₂O exchange, NH), 4.35–4.31 (m, 1H), 4.09–3.88 (m, 5H), 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.52–3.38 (m, 3H), 2.41–2.35 and 2.27–2.07 (2 m, 3H), 1.77–1.60 (m, 1H), 1.43, 1.41 and 1.36 (3 s, 9H, 3 CH₃), 0.94 (br s, 6H, 2 CH₃_{Leu}). ¹³C NMR (CDCl₃, rotamers present) δ: 172.01 (C), 171.34 and 171.28 (C), 169.95 (C), 154.25 (C), 81.57 and 80.88 (C), 65.41 and 65.11 (CH), 58.46 and 58.36 (CH), 57.74 and 57.27 (CH), 54.18, 53.82, 53.70 and 52.40 (2 CH₂), 52.20 (CH₃), 42.08 and 40.74 (CH), 40.97 (CH₂), 32.10 and 30.65 (CH₂), 31.11 (CH), 28.26 and 28.15 (3 CH₃), 19.13, 18.40 and 17.68 (2 CH₃). ESI-TOF MS, *m/z* (%): 518.2 [(M + Na)⁺, 100].

L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valylglycine (15b**).** Methyl ester **14b** (80 mg, 0.16 mmol) was converted to the carboxylic acid by the same procedure as used to make **2**, reaction time 3 h, to afford **15b** (70 g, 91%) as a white solid; mp = 132–134 °C. [α]_D²⁵ +7.18 (*c* 1.10, MeOH). IR (solid) ν: 3311, 2974, 2936, 2101, 1681, 1652, 1610, 1540, 1448, 1393, 1367, 1256, 1167, 1138 cm^{−1}. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ: 9.48, 9.27, 9.0 and 8.80 (4 br s, 2H, D₂O exchange 2 NH), 5.24–4.90 (m, 4H, one of them D₂O exchange, CO₂H), 4.72–4.69, 4.61–4.58, 4.48–4.30 (3 m, 3H), 4.14–4.10, 3.79–3.74 and 3.65–3.52 (3 m, 3H), 2.68–2.61, 2.55–2.40, 2.36–2.25 (3 m, 3H), 1.87–1.77 (m, 1H), 1.62 and 1.55 (2 s, 9H, 3 CH₃), 1.16–1.13 (m, 6H, 2 CH₃_{Val}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ: 175.72 (C), 173.25 (C), 172.13 (C), 155.26 (C), 80.59 and 80.51 (C), 65.71 and 65.30 (CH), 60.32 and 59.62 (CH), 58.66 and 58.10 (CH), 54.54, 53.90, 53.82 and 53.09 (2 CH₂), 44.61 (CH₂), 42.87 and 41.70 (CH), 32.24 and 30.90 (CH₂), 31.8 and 31.24 (CH), 28.56 and 27.43, (3 CH₃), 19.99, 19.93, 19.51 and 18.83 (2 CH₃). ESI-TOF MS, *m/z* (%): 504.23 [(M + Na)⁺, 77], 448 (20), 426 (24), 382 (100), 351 (24).

L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)]prolyl-L-valylglycinamide (16b**).**

Methyl ester **14b** (100 mg, 0.20 mmol) was treated with a concentrated solution of ammonia in MeOH (10 mL) by the same procedure as used to make **8a**, to afford **16b** (96 mg, 99%) as a white

solid, mp = 70–72 °C. $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +21.64$ (*c* 1.10, MeOH). IR (solid) ν : 3297, 2970, 2931, 2099, 1648, 1534, 1450, 1366, 1255, 1168, 1137, 775 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , rotamers present) δ : 7.90, 7.49–7.42, 6.95–6.92 and 6.72–6.79 (br s and 4 m, 4H, D_2O exchange, 2 NH and NH_2), 6.08 and 5.84 (2 br s, 1H, D_2O exchange, NH), 4.26–4.21 (m, 1H), 4.10–4.01, 3.97–3.90 and 3.71–3.65 (3 m, 5H), 3.51–3.43 (m, 3H), 2.54–2.48, 2.39–2.31, 2.19–2.13 and 2.06–2.01 (4 m, 4H), 1.76–1.70 and 1.67–1.61 (2 m, 1H), 1.44, 1.41 and 1.37 (3 s, 9H, 3 CH_3), 1.01–0.89 (m, 6H, 2 $\text{CH}_{3\text{Val}}$). ^{13}C NMR (CDCl_3 , rotamers present) δ : 173.02 and 172.86 (C), 172.28 (C), 171.58 and 171.45 (C), 154.43 and 154.30 (C), 81.95 and 80.95 (C), 65.74, 65.40 and 65.10 (CH), 59.68, 59.41 and 59.29 (CH), 57.83, 57.65 and 57.36 (CH), 54.09, 53.68, 53.56, 53.39, 53.04 and 52.44 (2 CH_2), 43.03 and 42.68 (CH_2), 42.10, 41.17 and 40.95 (CH), 32.19 and 30.66 (CH_2), 30.79 and 30.43 (CH), 28.41, 28.33 and 28.21 (3 CH_3), 19.32, 18.56, 17.85 and 16.97 (2 CH_3). ESI-TOF MS, m/z (%): 503.3 $[(\text{M} + \text{Na})^+]$, 100].

Methyl L-[(3*R*,5*S*)-3,5-bis(azidomethyl)]prolyl-L-valylglycinate hydrochloride (17b). The same procedure as used to make compound **9a** was used on **14b** (60 mg, 0.12 mmol) to give **17b** (47 mg, 90 %) as a beige low melting solid. $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +18.61$ (*c* 1.0, MeOH). IR (solid) ν : 3247, 3058, 2103, 1748, 1653, 1540, 1370, 1263, 1208, 1178, 1036 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : 9.69–9.55 (m, 2H, D_2O exchange, 2 NH), 8.52 (br s, 2H, D_2O exchange, $^+\text{NH}_2$), 4.93–4.89 (m, 1H), 4.76 and 4.65 (2 d, $J = 7$ Hz and $J = 7$ Hz, 1H), 4.44 and 4.35 (dd and d, $J = 17.2$, 5.5 Hz and $J = 17.2$ Hz, 1H), 4.23–4.18 (m, 1H), 4.06–3.92 (m, 3H), 3.85–3.82 (m, 1H), 3.58 and 3.54 (2 s, 3H, CH_3), 2.93–2.91 (m, 1H), 2.44–2.39 (m, 1H), 2.35–2.30 (m, 1H), 1.79–1.74 (m, 1H), 1.20–1.17, 1.06 and 1.0 (m, and 2 d, $J = 6.2$ Hz and $J = 6.2$ Hz, 6H, 2 $\text{CH}_{3\text{Val}}$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 172.47 (C), 170.89 (C), 170.77 (C), 62.98 (CH), 59.67 (CH), 59.45 (CH), 53.55 (CH_2), 52.95 (CH_2), 51.87 (CH_3), 44.69 (CH), 41.49 (CH_2), 33.97 (CH_2), 31.51 (CH), 19.67 and 18.59 (2 CH_3). ESI-TOF HRMS, m/z : $[\text{M}]^+$, ($\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{ClN}_9\text{O}_4$) 396.2101, requires 396.2103.

L-[(3*R*,5*S*)-3,5-Bis(azidomethyl)]prolyl-L-valylglycine hydrochloride (18b). The same procedure as used to make compound **9a** was used on **15b** (50 mg, 0.10 mmol) to give **18b** (37 mg, 85 %) as a pale yellow low melting solid. $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +4.60$ (*c* 0.98, MeOH). IR (solid) ν : 3236, 3058, 2963, 2104, 1725, 1656, 1546, 1393, 1257, 1205, 1114, 1032 cm^{-1} . ^1H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : 9.70–9.63 and 7.81 (m and br s, 5H, D_2O exchange, 2 NH, $^+\text{NH}_2$, CO_2H), 5.04–5.0 (m, 1H, 2- H_{Leu}), 4.68–4.50 (m, 2H), 4.37 (dd, $J = 17.2$, 5.5 Hz, 1H), 4.0–3.93 (m, 3H), 3.78–3.68 (m, 2H), 2.94–2.87 (m, 1H), 2.53–2.45 (m, 1H), 2.29–2.23 (m, 1H), 1.72–1.65 (m, 1H), 1.22–1.20 and 1.08 (m and dd, $J = 24.2$, 6.3 Hz, 6H, 2 $\text{CH}_{3\text{Val}}$). ^{13}C NMR (pyridine-*d*₅) δ : 172.90 (C), 172.49 (C), 171.55 (C), 63.19 (CH), 59.45 (2 CH), 53.90 (CH_2), 53.41 (CH_2), 44.85 (CH), 42.07 (CH_2), 34.26 (CH_2), 31.64

(CH), 19.77 and 18.69 (2 CH₃). ESI-TOF HRMS, m/z : [M]⁺, (C₁₄H₂₅N₁₀O₃) 382.1950, requires 382.1946.

L-[(3R,5S)-3,5-Bis(azidomethyl)prolyl-L-valylglycinamide hydrochloride (19b). The same procedure as used to make compound **9a** was used on **16b** (60 mg, 0.12 mmol) to give **19b** (50 mg, 96 %) as a low melting beige solid. [α]_D²⁵ +21.62 (*c* 1.11, MeOH). IR (solid) ν : 3291, 2966, 2101, 1655, 1635, 1539, 1373, 1264 cm⁻¹. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, rotamers present) δ : [9.61–9.59 (m), 8.41 (br s), 8.32 (br s), 8.18 (br s), 8.09 (br s) and 6.98 (br s), whole integrates to 6H, D₂O exchange, 2 NH, NH₂ and ⁺NH₂], 4.88–4.84 (m, 1H, 2-H_{val}), 4.61 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 2-H_{Pro}), 4.48 and 4.43–4.40 (t, *J* = 4.6 Hz, and m, 2H, 2-H_{2gly}), 4.09–3.90 (m, 3H), 3.84–3.63 (m, 2H), 2.95–2.88 (m, 1H), 2.46–2.38 (m, 1H), 2.33–2.24 (m, 1H), 1.76–1.68 (m, 1H), 1.16–1.0 (m, 6H, 2 CH_{3Val}). ¹³C NMR (pyridine-*d*₅) δ : 172.30 (C), 172.23 (C), 171.45 (C), 62.96 (CH), 60.0 (CH), 59.61 (CH), 53.66 (CH₂), 53.10 (CH₂), 44.65 (CH), 43.26 (CH₂), 33.96 (CH₂), 31.26 (CH), 19.73 and 18.75 (2 CH_{3Val}). ESI-TOF HRMS, m/z : [M]⁺, (C₁₄H₂₅N₁₀O₃) 381.2126, requires 381.2106.

Dopamine D₂ Receptor Binding Assay. The effect of compounds **9a–11a**, **9b**, **11b**, **17a–19a** and **17b–19b** on [³H]NPA binding was analyzed by carrying out receptor binding studies. Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing human D₂ receptors were grown in 150 mm petri dishes in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10%FBS and 2 mM L-glutamine. When cells were confluent, the medium was removed and cells were washed twice with buffer A (5 mM Tris-HCl pH = 7.4, 2 mM EDTA). Cells were scraped and homogenized twice in a Polytron. The cell suspension was centrifuged (300 g, 10 min, 4 °C). The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged (48400 g; 4 °C; 60 min). The pellet was resuspended in buffer B (50 mM Tris-HCl; pH = 7.4) and protein quantity was measured by the Bradford method.³⁶

The binding of [³H]*N*-propylnorapomorphine (NPA) to the membrane preparation was assayed in duplicate in 96-well plates. Membranes (30 μ g/well) expressing human D₂ receptor were incubated with 0.25 nM [³H]NPA and test compounds for 60 min at 25 °C in a 96-well polypropylene microplate with incubation buffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7.4; 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) up to a total volume of 250 μ L. Non-specific binding was defined in the presence of 1 μ M (+)-butaclamol.

After the incubation time 200 μ L were transferred to a multiscreen FC microplate (Millipore) pre-treated with 0.5% polyethyleneimine and samples were filtered and washed 4 times with 250 μ L of wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH=7.4; 0.9% NaCl). Filters were dried and 35 μ L of scintillation

cocktail (Universol) were added to each well and radioactivity was detected in a microplate beta-scintillation counter (Microbeta Trilux).

Data are expressed as the increase of specific binding following the formula: % Increase = $\frac{((X - NSB) * 100)}{(BT - NSB)} - 100$; where X is the radioactivity detected in the test well; BT is the radioactivity detected when [3 H]NPA was incubated in the absence of any compound and NSB is the radioactivity detected when [3 H]NPA was co-incubated with 10 μ M (+)-butaclamol.

ANOVA analysis was carried out to evaluate significant differences using SPSS software (V15.0). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Supporting Information Available: Elemental analysis Results. This material is available free of charge via Internet at [Http://pubs.acs.org](http://pubs.acs.org).

References

1. Martins, M. B.; Carvalho, I. Diketopiperazines: Biological Activity and Synthesis. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9923-9932.
2. Imming, P.; Sinning, C.; Meyer, A. Drugs, their Targets and the Nature and Number of Drug Targets. *Nat. Rev. Drugs. Discov.* **2006**, *5*, 821-834.
3. Karoyan, P.; Sagan, S.; Lequin, O.; Quancard, J.; Lavielle S.; Chassaing, G. Substituted Prolines: Syntheses and Applications in Structure-Activity Relationship Studies of Biologically Active Peptides. In *Targets in Heterocyclic Systems. Chemistry and Properties* Attanasi, O.A. and Spinelli, D. Eds. Vol. 8, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005; pp. 216-273.
4. Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. V.; Williams, C. E.; Gluckman, P. D. Neuroprotective Effects of the N-terminal Tripeptide of IGF-1, Glycine-proline-glutamate, in the Immature Rat Brain after Hypoxic-ischemic Injury. *Brain Res.* **2001**, *922*, 42-50.
5. Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R.; Gluckman, P. N-terminal Tripeptide of IGF-1 (GPE) Prevents the Loss of TH Positive Neurons after 6-OHDA Induced Nigral Lesion in Rats. *Brain Res.* **2000**, *859*, 286-292.
6. Alexi, T.; Hughes, P. E.; Van Roon-Mom, W. M. C.; Faull, R. L. M.; Williams, C. E.; Clark, R. G.; Gluckman, P. D. The IGF-I Amino-terminal Tripeptide Glycine-proline-glutamate (GPE) is

- Neuroprotective to Striatum in the Quinolinic Acid Lesion Animal Model of Huntington's Disease. *Exp. Neurol.* **1999**, *159*, 84-97.
7. Mishra, R. K.; Chiu, S.; Chiu, P.; Mishra, C. P. Pharmacology of L-Prolyl-L-leucylglycinamide (PLG): a Review. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1983**, *5*, 203-233.
8. Bhargava, H. N. Effects of Prolyl-leucyl-glycinamide and Cyclo(leucyl-glycine) on the Supersensitivity of Dopamine Receptors in Brain Induced by Chronic Administration of Haloperidol to Rats. *Neuropharmacology* **1984**, *23*, 439-444.
9. Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. J. Interaction of L-Prolyl-L-leucylglycinamide with Dopamine D₂ Receptor: Evidence for Modulation of Agonist Affinity States in Bovine Striatal Membranes. *Neurochem.* **1988**, *50*, 960-968.
10. Mishra, R. K.; Srivastava, L. K.; Johnson, R. L. Modulation of High-affinity CNS Dopamine D₂ Receptor by L-Pro-L-Leu-glycinamide (PLG) Analog 3(R)-(N-L-Prolylamino)-2-oxo-1-pyrrolidineacetamide. *Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* **1990**, *14*, 821-827.
11. Khan, R. S.; Yu, C.; Kastin, A. J.; He, Y.; Ehrensing, R. H.; Hsueh, H.; Stone, K. P.; Pan, W. Brain Activation by Peptide Pro-Leu-Gly-NH₂ (MIF-1). *International Journal of Peptides* **2010**, 537-639.
12. Ott, M. C.; Costain, W. J.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. L-Prolyl-L-leucyl-glycinamide and its Peptidomimetic Analog 3(R)-[(2(S)-Pyrrolidylcarbonyl)amino]-2-oxo-1-pyrrolidineacetamide (PAOPA) Attenuate Haloperidol-induced c-Fos Expression in the Striatum. *Peptide*, **2000**, *21*, 301-308.
13. Fisher, A.; Mann, A.; Verma, V.; Thomas, N.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Design and Synthesis of Photoaffinity-labeling Ligands of the L-Prolyl-L-leucylglycinamide Binding Site Involved in the Allosteric Modulation of the Dopamine Receptor. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 307-317.
14. Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J. M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K. Modulation of Agonist Binding to Human Dopamine Receptor Subtypes by L-Prolyl-L-leucyl-glycinamide and a Peptidomimetic Analog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1228-1236.
15. Gulati, A.; Bhargava, H. N. Effect of Melanotropin Release Inhibiting Factor on Changes by Haloperidol and Centbutindole in Cerebral Cortical 5-Hydroxytryptamine Receptors. *Pharmacology* **1990**, *41*, 98-106.

16. Miller, L.; Kastin, A. J. MIF-1 and Tyr-MIF-1 do not Alter GABA Binding on the GABA_A Receptor. *Brain Res. Bull.* **1990**, *25*, 917-918.
17. Ferreira Da Costa, J.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E. Synthesis of Methyl (±)-3,5-bis(Substitutedmethyl)pyrrolidine-2-carboxylates: a Convenient Approach to Proline-mimetics. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6797-6805.
18. Vartak, A. P.; Skoblenick, K.; Thomas, N.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Allosteric Modulation of the Dopamine Receptor by Conformationally Constrained Type VI *a* -Turn Peptidomimetics of Pro-Leu-Gly-NH₂. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6725-6729.
19. Saitton, S.; Del Tredici, A. L.; Mohell, N.; Vollinga, R. C.; Boström, D.; Kihlberg, J.; Luthman, K. Design, Synthesis and Evaluation of a PLG Tripeptidomimetic Based on a Pyridine Scaffold. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6595-6602.
20. Dolbeare, K.; Pontoriero, G. F.; Gupta, S. K.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Synthesis and Dopamine Receptor Modulating Activity of 3-Substituted J -Lactam Peptidomimetics of L-Prolyl-L-leucyl-glycinamide. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 727-733.
21. Subasinghe, N. L.; Bontems, R. J.; McIntee, E.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Bicyclic Thiazolidine Lactam Peptidomimetics of the Dopamine Receptor Modulating peptide Pro-Leu-Gly-NH₂. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2356-2361.
22. Johnson, R. L.; Rajakumar, G.; Yu, K-L.; Mishra, R. K. Synthesis of Pro-Leu-Gly-NH₂ Analogs Modified at the Prolyl Residue and Evaluation of their Effects on the Receptor Binding Activity of the Central Dopamine Receptor Agonist, ADTN. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2100-2104.
23. Saitton, S.; Del Tredici, A. L.; Saxin, M.; Stenström, T.; Kihlberg, J.; Luthman, K. Synthesis and Evaluation of Novel Pyridine Based PLG Tripeptidomimetics. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1647-1654.
24. Mishra, R. K.; Marcotte, E. R.; Chugh, A.; Barlas, C.; Whan, D.; Johnson, R. L. Modulation of Dopamine Receptor Agonist-induced Rotational Behavior in 6-OHDA-lesioned Rats by a Peptidomimetic Analog of Pro-Leu-Gly-NH₂ (PLG). *Peptides* **1997**, *18*, 1209-1215.
25. Sharma, R. K.; Paladino, P.; Gabriele, J.; Saeedi, H.; Henry, P.; Chang, M.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Pro-Leu-glycinamide and its Peptidomimetic, PAOPA, Attenuate Haloperidol Induced Vacuous Chewing Movements in Rat: A Model of Human Tardive Dyskinesia. *Peptides* **2003**, *24*, 313-319.

26. (a) Humphrey, J. M.; Chabberlin, A. R. Chemical Synthesis of Natural Product Peptides: Coupling Methods for the Incorporation of Noncoded Amino Acids into Peptides. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266; (b) Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. Use of Onium Salt-based Coupling Reagents in Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683; (c) Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467; (d) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
27. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillesen, D. New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
28. The crystallographic data for compounds **3a** and **11a** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as Supplementary Publications CCDC 924409 and CCDC 924408 respectively. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.
29. Momany, F. A.; McGuire, R. F.; Burgess, A. W.; Scheraga, H. A. Energy Parameters in Polypeptides. VII. Geometric Parameters, Partial Atomic Charges, Nonbonded Interactions, Hydrogen Bond Interactions, and Intrinsic Torsional Potentials for the Naturally Occurring Amino Acids. *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 2361-2381.
30. Kang, Y. K.; Kang, S. N. Conformational Preferences of *N*-Methoxycarbonyl Proline Dipeptide. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 1116-1127.
31. (a) Drakenberg, T.; Dahlqvist, K.-I.; Forsen, S. Barrier to Internal Rotation in Amides. IV. *N,N*-Dimethylamides. Substituent and Solvent Effects. *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 2178-2183. (b) Eberhardt, E. S.; Loh, S. N.; Hinck, A. P.; Raines, R. T. Solvent Effects on the Energetics of Prolyl Peptide Bond Isomerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5437-5439.
32. Cox, C.; Lectka, T. Solvent Effects on the Barrier to Rotation in Carbamates. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2426-2427.
33. Kang, Y. K.; Choi, H. Y. *cis-trans* Isomerization and Puckering of Proline Residue. *Biophys. Chem.* **2004**, *111*, 135-142.
34. Deber, C. M. Evidence of J-Turn Analogs in Proline Peptides in the Solid State. Infrared Study. *Macromolecules*, **1974**, *7*, 47-51.

35. Baures, P. W.; Ojala, W. H.; Gleason, W. B.; Johnson, R. L. Conformational Analysis of Homochiral and Heterochiral Diprolines as β -Turn-forming Peptidomimetics: Unsubstituted and Substituted Models. *J. Peptide Res.* **1997**, *50*, 1-13.

36. Bradford, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.





Synthesis of 3,5-Dimethyl-substituted Proline Derivatives; Application to the Synthesis of Proline-Modified Analogues of the Neuroprotective Agent Glycine-L-Proline-L-Glutamic acid (GPE)

Joana Ferreira da Costa, Olga Caamaño*, Franco Fernández, Xerardo García-Mera

Departamento de Química Orgánica, Facultade de Farmacia, Campus Vida s/n, Universidade de Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

The readily available starting material methyl (2*RS*,3*SR*,5*RS*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylate was used to synthesise a number of racemic methyl 3,5-dimethylamino-substituted prolinates. The utility of these compounds as synthons in the preparation of new analogues of the neuroprotective agent GPE has been demonstrated through the preparation of tripeptide **14**.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of plaques containing β -amyloid ($A\beta$) and neuronal loss.¹ In the brain of patients with AD the somatostatin (SRIF) level is diminished in the temporal cortex.² The effects of SRIF are mediated by five SRIF receptor subtypes coupled via G proteins to different signal transduction pathways, which are located in diverse brains areas including the temporal cortex. A marked loss of SRIF receptors has been reported in the cortex of AD patients³ and diverse approaches have been tested to block $A\beta$ toxicity and diminish the progression of AD.

Moreover, insulin-like growth factor-I (IGF-I) plays an important role in brain development and is strongly expressed during recovery after a hypoxic-ischemic injury. This factor has potent antiapoptotic effects on neurons and glia^{4,5} and its induction after injury is thought to restrict cell death; further interbrain treatment with IGF-I can reduce the extent of brain cell after injury.⁶⁻⁸ The use of this factor in AD is restricted due to its limited ability to cross the blood-brain barrier and also because of potential mutagenic effects.⁹ However, IGF-I is cleaved in brain into des-(1-3)-IGF-I and the *N*-terminal

tripeptide Gly-Pro-Glu (GPE),¹⁰ whose small size and stability in the CNS make it a good candidate for use in clinical therapies. Indeed, the administration of GPE following ischemic brain injury reduces apoptosis and inhibits microglial proliferation¹¹ and GPE also showed a protective effect on the SRI system in the temporal cortex of A β 25-35 treated rats.¹²

The knowledge gained to date shows that GPE acts as a survival factor against A β insult in brain and suggests a possible new therapeutic strategy for the treatment of CNS injuries and neurodegenerative disorders. However, the poor pharmacological profiles of this compound highlight the need to develop better analogues.

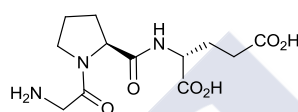


Figure 1. Structure of GPE

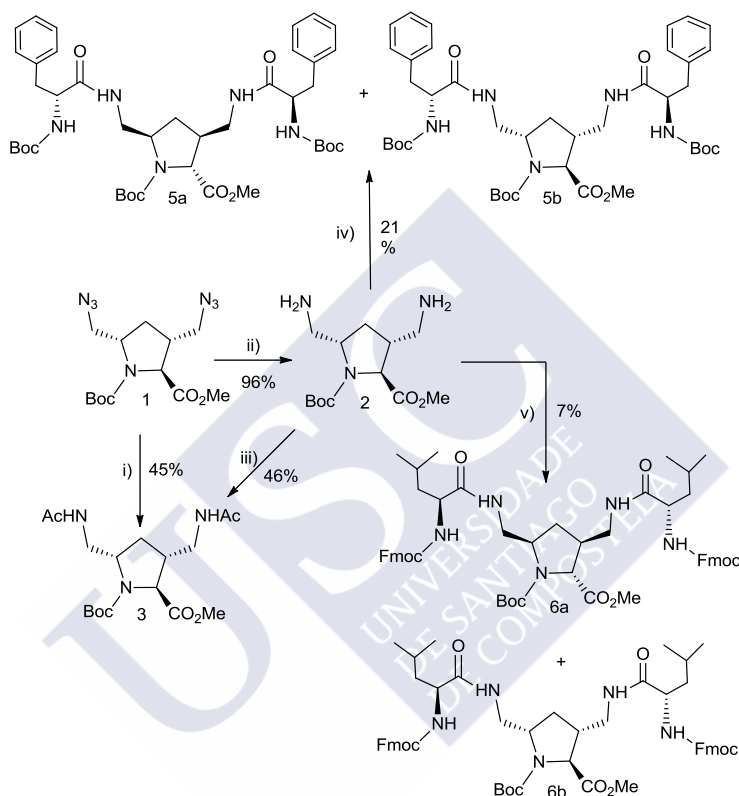
The structural simplicity of GPE renders it a suitable lead molecule for the development of novel strategies for the enlargement of new drugs that have a sufficiently low molecular weight and are lipophilic enough to cross the blood-brain barrier. Several analogues of GPE have previously been synthesised with modifications at the side chains of either the glutamic acid,¹³⁻¹⁷ glycine,^{18,19} or proline^{15,19,20} residues in order to explore the structure-activity relationships (SAR) of GPE and to identify analogues with better neuroprotective activities than the natural tripeptide.

With these aims in mind, we embarked on a synthetic programme focused on the modification of the L-proline residue of GPE in order to investigate its importance on the neuroprotective activities. The general synthetic strategy employed involved the preparation of several modified proline residues that were then coupled to *N*-Boc-glycine-OH and glutamic dimethyl ester hydrochloride.

In a previous publication²¹ we described the synthesis of 3,5-disubstituted proline derivatives as potential scaffolds in the synthesis of peptides with pharmacological activity. We report here the preparation of other 3,5-disubstituted proline derivatives (Scheme 1) and their use in the synthesis of analogues of GPE in which the proline residue has been modified (Scheme 2).

Results and discussion

With the purpose of contributing to the growing interest in finding substituted cyclic amino acids, in this study we also carried out the synthesis of 3,5-diaminomethyl proline derivative **2** and several 3,5-diamide proline derivatives **3–5** (Scheme 1). These compounds have potential as scaffolds in the synthesis of peptides with pharmacological activity.



Scheme 1. Reagents and conditions: i) a) PPh₃, THF, 70 °C, 5.5 h; b) H₂O, 40 °C, 15 h; c) Ac₂O, CH₂Cl₂, pyridine, rt, 4 h; ii) H₂, Pd-C 10%, EtOAc, rt, 18 h; iii) Ac₂O, pyridine, rt, 6 h; iv) N-Boc-D-Phe-OH, THF, HOBT, DIC, rt, 3 h; v) N-Fmoc-L-Leu-OH, THF, HOBT, DIC, rt, 4 h.

The reaction of a carboxylic acid with an amine to give an amide requires activation of the carboxylic acid. This activation is often carried out with an active ester that is normally prepared in situ using carbodiimides or onium salts. In all cases the key factor in the process is the leaving group.

The Staudinger–Vilarrasa coupling constitutes an interesting pathway for the synthesis of amides.²² This approach is presented as an attractive water-compatible variant of a modified Staudinger coupling and it involves an organo-azide and a suitable activated *N*-protected α -amino acid or unprotected α -hydroxy acid. This coupling is advantageous

from a synthetic point of view as it gains one synthetic step and is not sensitive to the chemical stability of the amino derivative. For these reasons we tested this reaction for the synthesis of the diacetamide ester **3** and diglycinamide ester **4** by following a previously described methodology in which Ph_3P and Ac_2O ²³ or $n\text{Bu}_3\text{P}$, PHOBt , DIC and Boc-Gly-OH , respectively, were used.²⁴

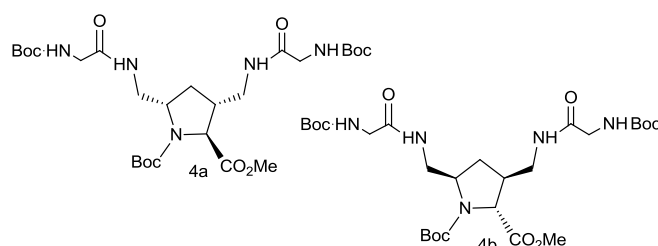


Figure 2. Structure of 4a and 4b mixture

In the first case, compound **3** was synthesised in a poor-to-moderate yield (approximately 45% for the two steps), as estimated by ^1H NMR analysis of the resulting residue after the removal of solvent from the appropriate combination of fractions obtained by chromatographic separation of the crude reaction mixture. The reaction mixture contained significant amounts of triphenylphosphine oxide, which was very difficult to remove. In the second case, two attempts were made to obtain compound **4** by the Staudinger–Vilarrasa coupling and these were unsuccessful.

Therefore, the catalytic hydrogenation of ester **1**²¹ to diaminomethyl compound **2** (which proceeded with excellent yield) and subsequent reaction with the corresponding acid derivative was chosen for the preparation of amides **3**, **5** and **6**.

Among the current reagents of choice for peptide bond formation are carbodiimides,²⁵ uronium and guanidinium salts and phosphonium salts, along with 1-hydroxybenzotriazole (HOBt),²⁶ bis(2-oxo-3-oxazolidinyl) phosphinic chloride (BoPCl),²⁷ or 2-(1-*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU).²⁸

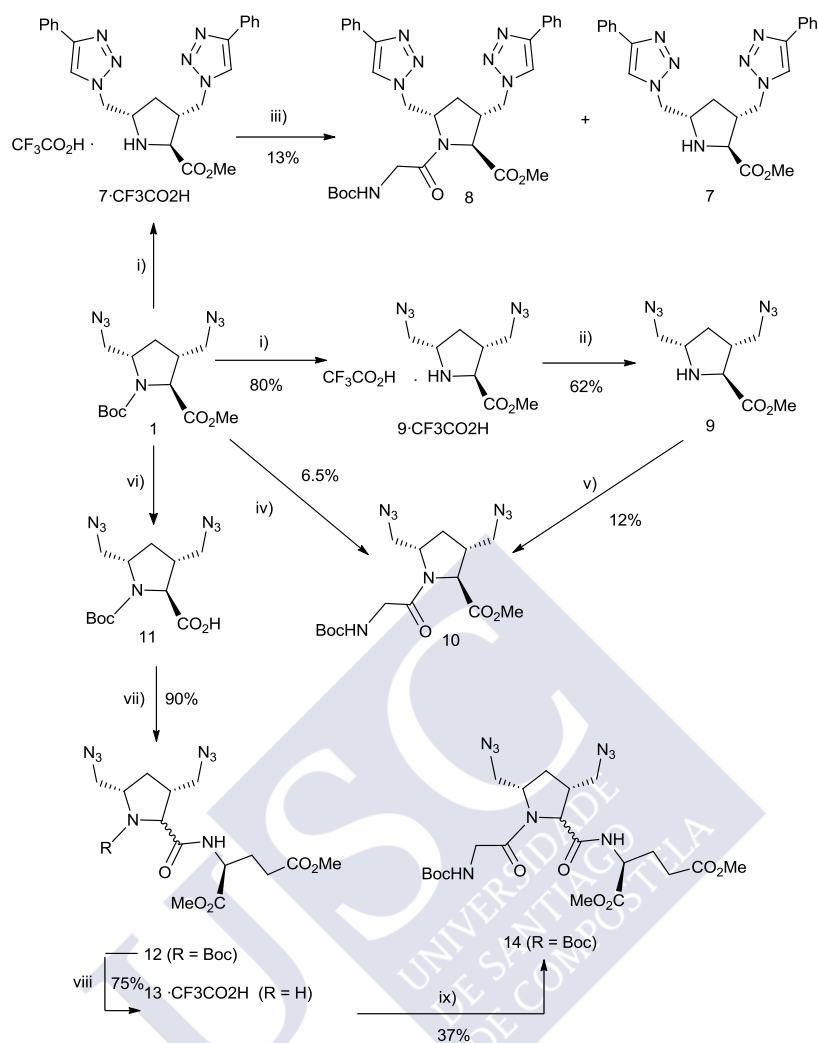
In the case of ditriazole building block **7**· $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, the coupling was carried using the anhydride activation procedure with $i\text{BuOCOC}$ l.²⁰ This approach was used to synthesise the desired dipeptide **8** in very low yield (entries 1 and 2, Table 1). For the preparation of the dipeptide **10**, compound **1**²¹ was first treated with Boc-glycine in the presence of TFA and BoPCl ,²⁰ to give the desired dipeptide **10** (entry 4, Table 1) in low yield. In a second attempt, another protocol was used, i.e. TBTU ²⁹ and the Boc -deprotected diazide

9, the result was similar except that a substantial proportion of unreacted starting material was recovered (entry 5, Table 1). The peptide couplings to the *N*-terminus of the sterically hindered proline esters **7** and **9** proved to be extremely difficult, and even highly efficient peptide coupling reagents failed to give the desired dipeptides in reasonable yield.

Table 1: Trial synthesis of peptides 8, 10, 12, 14

Entry	Compound	Reagents and solvents	Time (h)	Results (%)
1	7 ·CF ₃ CO ₂ H	Boc-Gly-OH, iBuOCOC ₂ H ₅ , TEA, THF, H ₂ O	20	8 (13) + 7 (25)
2	7 ·CF ₃ CO ₂ H	Boc-Gly-OH, iBuOCOC ₂ H ₅ , TEA, THF, H ₂ O	120	8 (12)
3	7 ·CF ₃ CO ₂ H	Boc-Gly-OH, BoPCl, TEA, CH ₂ Cl ₂	17	7 (63)
4	1	Boc-Gly-OH, TFA, BoPCl, DIEA, CH ₂ Cl ₂	17	10 (6.5)
5	9	Boc-Gly-OH, TBTU, DIEA, CH ₂ Cl ₂	52	10 (12) + 9 (48)
6	11	L-glutamic dimethyl ester hydrochloride, TBTU, DIEA, CH ₂ Cl ₂	48	12 (90)
7	13 ·CF ₃ CO ₂ H	Boc-Gly-OH, BoPCl, TEA, CH ₂ Cl ₂	72	14 (37)

As an alternative, the carboxylic acid **11**³⁰ was coupled with L-glutamic dimethyl ester hydrochloride and this gave dipeptide **12** in a much more satisfactory yield (entry 6, Table 1). However, this process gave a mixture of diastereomers **12**, the resolution of which proved impossible by column or thin layer chromatography. The subsequent coupling of **13**·CF₃CO₂H with Boc-glycine enabled the isolation of a mixture of diastereomers **14**, which also proved impossible to resolve.



Scheme 2. Reagents and conditions: i) Reference 21; ii) NaHCO₃, 2 h, rt; iii) Boc-Gly-OH, iBuOCOCI, TEA, THF, H₂O, 20 h, rt; iv) a) Boc-Gly-OH, TFA, CH₂Cl₂, 2 h; b) BoPCl, DIEA, CH₂Cl₂, 17 h, rt; v) Boc-Gly-OH, TBTU, DIEA, CH₂Cl₂, 63 h, rt; vi) reference 31; vii) L-glutamic dimethyl ester hydrochloride, TBTU, DIEA, CH₂Cl₂, 16 h, rt; viii) TFA, CH₂Cl₂, 4 h, rt; ix) Boc-Gly-OH, BoPCl, TEA, CH₂Cl₂, 72 h, rt.

In an effort to overcome these obstacles, and at the same time to evaluate the influence that the protective group has on the outcome of the coupling, the reactions of **13**·CF₃CO₂H with other carbamates of glycine, i.e. fluorenylmethyloxy carbamate and benzyloxy carbamate were carried out under similar conditions to those employed in the trial 7 (Table 1). In these cases, the reactions led to complex mixtures of compounds in which the presence of the corresponding tripeptides was detected (¹H NMR). However, these mixtures proved extremely difficult to purify and it was more complicated to isolate the mixture of the corresponding diastereomers.

Conclusion

The procedure described here contributes to the pool of the available proline-like structures. This field is currently very active with the aim of obtaining new proline-mimetic therapeutic agents. In summary, the utility of compound **1**, as a versatile synthon for the preparation of a variety of 3,5-disubstituted proline-mimetics is reported. These derivatives are applicable for the synthesis of new analogues of the neuroprotective agent GPE, as demonstrated by the preparation of the tripeptide **14**.

Experimental

General methods

All chemicals were of reagent grade and were obtained from Aldrich Chemical Co. and used without further purification. All air sensitive reactions were carried out under argon. Flash chromatography was performed on flash silica gel SDS type 60 A. C. C., 35-70 μm , and analytical TLC was carried out on pre-coated silica gel plates (Merck 60 F₂₅₄, 0.2 mm). Melting points were measured on a Reichert Kofler Thermopan apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were recorded on a JASCO FT/IR-4100 spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300, Varian Inova 400 spectrometers at 300 or 400 and 75 or 100 MHz, respectively, using TMS as an internal standard (chemical shifts in δ values, J in hertz). Mass spectra were recorded on Micromass Autospec or Bruker Microtoff spectrometers. Microanalyses were performed on a Thermo Finnigan Flash 1112 Elemental Analyser; all results shown are within < 0.4% of the theoretical values.

Methyl (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(aminomethyl)-1-(tert-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxylate (2).** A mixture of **1** (300 mg, 0.84 mmol) and 10% palladium on activated carbon (20 mg, 0.28 mmol) in dry EtOAc (14 mL) was stirred under an atmosphere of hydrogen at room temperature for 18 h. The reaction mixture was filtered through a CeliteTM pad with EtOAc (15 mL) and the filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure to give **2** as a colourless oil (245 mg, 96%). $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2931, 1741, 1691, 1455, 1436, 1390, 1365, 1255, 1198, 1168, 1123, 856, 779. δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 1.35 (6H, s, 2 CH₃), 1.41 (3H, s, CH₃), 1.62-1.68 (1H, m), 2.12-2.25 (2H, m), 2.71-2.88 (3H, m), 3.04 (dd, 1H, J = 12.7, 3.9 Hz), 3.69 (3H, s, CO₂CH₃), 3.85-3.91 (1H, m), 4.05-4.11 (1H, m). δ_{C} (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 28.40 (3 CH₃), 31.68 (CH₂), 45.10 (CH), 45.41 (CH₂), 45.50 (CH₂), 51.97

(CH₃), 60.76 (CH), 64.42 (CH), 80.34 (C), 154.40 (C), 173.58 (C). CI MS m/z : 289 (8), 288 [(M + 1)⁺, 49%], 216 (42), 214 (39), 213 (37), 190 (61), 188 (96), 173 (18), 172 (97), 170 (54), 156 (94), 155 (33), 142 (20), 141 (21), 140 (86), 128 (21), 126 (23), 125 (41), 111 (30), 109 (21), 108 (27), 99 (54), 97 (22), 96 (23), 94 (21), 85 (25), 84 (24), 83 (29), 82 (87), 81 (27), 80 (60), 71 (37), 70 (26), 69 (45), 68 (74), 67 (29), 61 (31), 59 (30), 58 (44), 57 (98), 56 (100), 55 (85). CI HRMS, m/z : 288.1932 [MH]⁺, (C₁₃H₂₅N₃O₄) requires 288.1923.

Methyl (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(acetamidomethyl)-1-*tert*-butoxycarbonylpyrrolidine-2-carboxylate (3).** *Method A:* A mixture of **2** (50 mg, 0.18 mmol), Ac₂O (0.102 mL) and pyridine (0.087 mL) was stirred at room temperature for 6 h. The mixture was added H₂O (20 mL) and was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). The combined extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. The residue (42 mg) was chromatographed on silica gel, using 30:1 CH₂Cl₂/MeOH as eluant. Compound **3** (30 mg, 46%) was isolated as a white solid, mp = 188-190 °C. $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3282, 2975, 1741, 1696, 1656, 1543, 1436, 1366, 1246, 1198, 1169, 1138, 1041, 778. δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 1.38 (6H, s, 2 CH₃), 1.47 (3H, s, CH₃), 1.71 (1H, dt, J = 2.8, 13.7 Hz, 4-*HH*), 1.99 (3H, s, CH₃), 2.0 (3H, s, CH₃), 2.04-2.14 (1H, m, 4-*HH*), 2.46-2.51 (1H, m), 2.94-3.04 (1H, m), 3.31 (1H, dt, J = 5.0, 13.7 Hz), 3.61 (1H, dt, J = 8.2, 13.8 Hz, 5-H), 3.69 (3H, s, CO₂CH₃), 3.71-3.81 (1H, m), 3.91-3.96 (1H, m), 3.98 (1H, d, J = 2.2 Hz, 2-H), 6.66-6.68 (1H, m, D₂O exchange, NH), 7.12-7.16 (1H, m, D₂O exchange, NH). δ_{C} (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 23.13 (CH₃), 23.45 (CH₃), 28.14 (3 CH₃), 28.87 (CH₂), 41.50 (CH), 42.41 (CH₂), 43.32 (CH₂), 52.14 (CH₃), 58.52 (CH), 64.54 (CH), 80.96 (C), 154.97 (C), 170.84 (C), 171.14 (C), 172.89 (C). CI MS m/z : 372 [(M + 1)⁺, 13%], 344 (23), 316 (18), 300 (22), 273 (69), 272 (100), 256 (18), 254 (45), 213 (17), 199 (80), 153 (37), 80 (19), 60 (45), 57 (67), 56 (23), 55 (21). Anal. Calcd for C₁₇H₂₉N₃O₆ (371.43): C 54.97, H 7.87, N 11.31; found C 55.29, H 8.09, N, 11.65.

Method B: PPh₃ (243 mg, 0.93 mmol) was added portionwise to a solution of **1** (150 mg, 0.44 mmol) in THF (5 mL) and the mixture was stirred at 70 °C for 5.5 h. Water (0.66 mL) was added and the reaction mixture was stirred at 40 °C for 15 h. The THF was removed under reduced pressure and water was removed by azeotropic evaporation with toluene (3 x 10 mL) and ethanol (10 mL). To the residue was added CH₂Cl₂ (3 mL), pyridine (0.21 mL, 2.65 mmol) and Ac₂O (0.17 mL, 1.77 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. Water was added and the product was

extracted twice with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the residue (474 mg) was purified by column chromatography (silica gel, 3:1 hexane/EtOAc) to afford a mixture of P(O)Ph₃ and **3**. The yield was calculated by ¹H NMR analysis by comparison with the compound obtained by *Method A* (73 mg, 45% in the two steps), although it proved difficult to remove the triphenylphosphine oxide.

Methyl (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-N-(tert-butoxycarbonyl)-3,5-bis-[[[D-N-tert-butoxycarbonyl]phenylalanyl]amino]methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (mixture of **5a** and **5b**).** Boc-D-Phe-OH (240 mg, 0.91 mmol) was co-evaporated three times with 6 mL of freshly distilled THF under reduced pressure and the residue was dissolved in anhydrous THF (6 mL) at 0 °C. To this solution was added HOBt (162 mg, 1.20 mmol). The solution was stirred for 10 min at 0 °C and then DIC (186 µL, 1.20 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C and a solution of **2** (100 mg, 0.35 mmol) in anhydrous THF (4 mL) was added by syringe. The reaction mixture was allowed to reach room temperature over 3 h. After evaporation to dryness, the solid was then taken up with H₂O (30 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (15 mL) and water (15 mL) and dried over Na₂SO₄. After evaporation to dryness, the white solid (400 mg) was purified by column chromatography (silica gel, 3:1 and 1:1 hexane/EtOAc) to afford a mixture of **5** and other compounds (280 mg). This mixture was repurified by preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:2 hexane/EtOAc). The fractions that contained product (170 mg) were combined and purified by column chromatography (silica gel, 3:1, 2:1 and 1:1 hexane/EtOAc) to give **5** (56 mg, 21%) as a white solid, mp = 89-92 °C. $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3294, 2978, 2930, 1743, 1692, 1681, 1654, 1519, 1455, 1365, 1248, 1165, 1020, 737 cm^{-1} . δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 1.39, 1.38 and 1.36 (27H, 3 s, 9 CH₃), 1.43-1.53 (3H, m), 1.82-1.92 (2H, m), 2.28-2.35 (1H, m), 2.97-3.11 (5H, m), 3.42-3.32 (1H, m), 3.44-3.54 (1H, m), 3.62-3.65 (1H, m), 3.90 and 4.0-4.01 (1H, d and m, $J = 2.5$ Hz), 3.70 (3H, s, CO₂CH₃), 4.35-4.43 (2H, m, D₂O exchange, 2 NH), 5.04-5.08 (1H, m), 5.24-5.27 (1H, m), 6.90-7.34 (10H, m). δ_{C} (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 28.14 and 28.29 (9 CH₃), 32.33 (CH₂), 38.59 (CH₂), 41.57 (CH), 42.06 (CH₂), 42.46 (CH₂), 42.83 (CH₂), 52.14 (CH₃), 55.96 (CH), 58.34 (CH), 64.27 (CH), 72.25 (CH), 80.95 (2 C), 81.01 (C), 126.83 (CH), 127.0 (CH), 128.52 (2 CH), 128.65 (2 CH), 129.22 (2 CH), 129.35 (2 CH), 136.55 (C), 136.81 (C), 154.62 (2 C),

155.38 (C), 171.75 (C), 172.73 (2 C). ESI-TOF MS m/z : 804.4 [(M + Na)⁺, 100%]. Anal. Calcd for C₄₁H₅₉N₅O₁₀ (781.93): C 62.98, H 7.61, N 8.96; found C 63.25, H 7.87, N, 9.18

Methyl (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-N-(*tert*-butoxycarbonyl)-3,5-bis-[[[(2*S*)-2-[[[(9*H*)-fluoren-9-ylmethoxy]carbonyl]amino]-4-**

methylpentanoyl]amino]methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (mixture of 6a and 6b).

A solution of diamino ester **2** (100 mg, 0.35 mmol) in anhydrous THF (4 mL) was subjected to the same procedure as described for **5**, but using Fmoc-L-Lue-OH (320 mg, 0.91 mmol) and a reaction time of 4 h. After evaporation to dryness, the white solid (475 mg) was purified by column chromatography (silica gel, hexane-EtOAc, 1:3) to afford a mixture of **6** and other compounds (320 mg). This mixture was repurified by preparative thin layer chromatography (silica gel, 1:3hexane/EtOAc). The fractions that contained product (200 mg) were combined and purified by column chromatography (silica gel, 3:1 hexane/EtOAc) to give **6** (25 mg, 7%) as a white solid, mp = 91-93 °C. $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3311, 2955, 2927, 1743, 1692, 1652, 1527, 1449, 1366, 1248, 1170, 1042, 739 cm^{-1} . δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) 0.88-0.93 (12H, m, 4 CH₃_{Leu}), 1.37, 1.43 and 1.41 (9H, 3s, 3 CH₃), 1.47-1.70 (7H, m), 2.39-2.43 (m, 1H), 3.11-3.22 (m, 1H), 3.61-3.43 (m, 3H), 3.67 (3H, s, CO₂CH₃), 3.93-4.03 (m, 2H), 4.18-4.31 (5H, m), 4.37-4.46 (2H, m), 5.31-5.34 and 5.53-5.57 (1H, 2 m, D₂O exchange, NH), 7.11-7.18 (1H, m, D₂O exchange, NH), 7.38-7.31, 7.42-7.48, 7.62-7.67, 7.54 and 7.72 [18H, 3m and 2d, $J = 7.2$ Hz, $J = 7.5$ Hz, two of them D₂O exchange, 2 NH and 8 H x 2 Flu). δ_{C} (100 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) 21.78 (CH₃), 22.09 (CH₃), 22.93 (2 CH₃), 24.68 (2 CH), 28.11 and 28.35 (3 CH₃), 28.59 (CH₂), 28.65 (CH₂), 29.66 (CH₂), 41.64 (CH), 42.09 (CH₂), 42.90 (CH₂), 47.08 (CH), 47.11 (CH), 52.11 (CH₃), 53.42 (CH), 53.73 (CH), 58.22 (CH), 64.23 (CH), 67.03 (2 CH₂), 81.0 (C), 119.93 (4 CH), 125.01 (4 CH), 127.01 (4 CH), 127.68 (4 CH), 141.25 (4 C), 143.75 (4 C), 154.82 (C), 156.26 (C), 156.43 (C), 172.36 (C), 172.78 (2 C). ESI-TOF MS m/z : 980.5 [(M + Na)⁺, 100%]. Anal. Calcd for C₅₅H₆₇N₅O₁₀ (958.15): C 68.94, H 7.05, N 7.31; found C 69.20, H 7.25, N, 7.48.

Methyl (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-1-[2-(*tert*-butoxycarbonyl)amino]acetyl]-3,5-bis[(4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]pyrrolidine-2-carboxylate (8).**

Isobutyl chloroformate (0.03 mL, 0.22 mmol) was added to a stirred solution of Boc-Gly-OH (47.3 mg, 0.27 mmol) and TEA (0.032 mL, 0.23 mmol) in THF (2.4 mL) at 0 °C. The

cooling bath was removed and the mixture was stirred at room temperature for 10 min. A solution of **7**·CF₃-CO₂H (100 mg, 0.22 mmol) and TEA (0.032 mL, 0.23 mmol) in H₂O (1 mL) was added and the resulting solution was stirred for 20 h. The mixture was acidified with 2N HCl and compound **7** (20 mg, 25%) precipitated as a white solid, which was collected by filtration. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 10 mL) and the combined extracts were dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated in vacuo to yield a yellow solid (62 mg), which was purified by flash chromatography on silica gel (2:1.2 hexane-EtOAc) to give **7** (14 mg, 13%).

Compound **7**: white solid, mp = 151-153 °C. $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3493, 2420, 1749, 1587, 1431, 1224, 1077, 1186, 1163, 759. δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) 1.33 (9H, s, 3 CH₃), 1.93-2.0 (1H, m), 2.02-2.10 (1H, m), 2.44 (1H, dt, J = 14.3, 8.9 Hz), 2.92-2.99 (1H, m), 3.66-3.70 (3H, m, CO₂CH₃), 3.82-3.99 (4H, m), 4.12-4.18 (1H, m), 4.46-4.51 (1H, m), 4.81-4.86 (m, 1H), 5.05-5.11 (1H, m), 7.34-7.38 (2H, m), 7.41-7.47 (4H, m), 7.82-7.85 (5H, m) 7.92 (s, 1H). δ_{C} (100 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) 32.47 (CH₂), 41.68 (CH), 49.61 (CH₂), 50.84 (CH₂), 53.23 (CH₃), 58.56 (CH), 60.55 (CH), 122.10 (CH), 122.38 (C), 125.22 (4 CH), 127.99 (CH), 128.07 (CH), 128.96 (2 CH), 128.99 (2 CH), 130.50 (C), 130.64 (C), 146.46 (C), 146.48 (C), 168.36 (C). FAB MS m/z : 443 (M⁺, 40%), 285 (32), 273 (100), 231 (22), 145 (30), 116 (23), 80 (21).

Compound **8**: white solid, mp = 196-199 °C (EtOH). $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2925, 1744, 1707, 1419, 1351, 1206, 1175, 1157, 765. δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) 1.19 (9H, s, 3 CH₃), 1.80-1.86 (1H, m), 1.95-2.03 (1H, m), 2.30 (1H, dt, J = 8.9, 14.3 Hz), 2.85-2.92 (1H, m), 3.59-3.63 (3H, m, CO₂CH₃), 3.75-3.92 (4H, m), 4.05-4.11 (1H, m), 4.39-4.44 (1H, m), 4.74-4.79 (1H, m), 4.98-5.04 (1H, m), 7.27-7.31 (2H, m), 7.34-7.40 (4H, m) 7.75-7.78 (5H, m), 7.85 (s, 1H). δ_{C} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S) 28.28 (3 CH₃), 29.68 (CH₂), 42.22 (CH), 51.42 (CH₂), 52.38 (CH₂), 52.67 (CH₃), 58.40 (CH), 63.68 (CH), 72.30 (CH₂), 81.91 (C), 120.74 (CH), 121.26 (CH), 125.75 (2 CH), 125.79 (2 CH), 128.29 (CH), 128.46 (CH), 128.87 (2 CH), 128.98 (2 CH), 130.11 (C), 130.25 (C), 147.78 (C), 148.18 (C), 155.63 (C), 167.27 (C), 171.70 (C). EI MS m/z : 545 [(M + 2)⁺ - *t*-Bu, 7%], 544 [(M + 1)⁺ - *t*-Bu, 42], 543 [(M⁺ - *t*-Bu, 100], 516 (11), 515 (36), 457 (15), 456 (48), 399 (59), 343 (50), 240 (18), 239 (17), 182 (15), 159 (20), 146 (14), 145 (23), 140 (28), 94 (61), 91 (18), 89 (19), 82 (30), 80 (39), 77 (23), 68 (14), 67 (25),

59 (11), 57 (95). Anal. Calcd for $C_{31}H_{36}N_8O_5$ (600.67): C 61.99, H 6.04, N 18.65; found C 62.32, H 6.24, N, 18.47.

Methyl (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidomethyl)pyrrolidine-2-carboxylate (9).**

CF_3CO_2H (10.4 mL, 135.0 mmol) was added to a cooled (ice bath), stirred suspension of compound **1** (0.43 g, 1.27 mmol) in CH_2Cl_2 (25 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, after which the solvent was removed under reduced pressure to give a brown oily residue (0.40 g), which was treated with a mixture of EtOAc/Et₂O to give **9**· CF_3CO_2H as a white solid (0.36 g, 80%), mp = 104–106 °C. ν_{max}/cm^{-1} : 2970, 2098, 1755, 1662, 1593, 1439, 1419, 1369, 1301, 1253, 1224, 1176, 1121, 1047, 897, 836, 799, 719 cm^{-1} . δ_H (300 MHz; DMSO-*d*₆; Me₄S) 1.54 (1H, dt, *J* = 12.9, 9.9 Hz, 4-*HH*), 2.22–2.28 (1H, m, 4-*HH*), 2.63–2.69 (1H, m), 3.53–3.66 (4H, m), 3.72–3.72 (1H, m), 3.77 (3H, s, CO_2CH_3), 4.14 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, 2-H). δ_C (300 MHz; DMSO-*d*₆; Me₄S) 31.24 (CH_2), 41.15 (CH), 50.67 (CH_2), 51.38 (CH_2), 53.25 (CH_3), 58.0 (CH), 60.17 (CH), 168.62 (C). CI MS *m/z* %: 240 (M^+ , 1%), 184 (11), 183 (100), 180 (38), 126 (33), 106 (9), 95 (17), 94 (12), 82 (16), 80 (25), 69 (35), 68 (19), 59 (12), 56 (8), 55 (7), 54 (7), 51 (11).

The salt **9**· F_3CCO_2H (250 mg, 0.71 mmol) was dissolved in saturated $NaHCO_3$ (30 mL) and the resulting solution was stirred for 2 h and extracted with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic extracts were dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated in vacuum to yield **9** as a pale yellow oil (105 mg, 62%). ν_{max}/cm^{-1} : 2928, 2091, 1732, 1434, 1264, 1264, 1210, 1138, 912, 753. δ_H (300 MHz; $CDCl_3$; Me₄S) 1.37 (1H, dt, *J* = 9.1, 12.7 Hz, 4-*HH*), 2.12 (1H, ddd, *J* = 6.6, 7.7, 12.7 Hz, 4-*HH*), 2.40–2.52 (1H, m), 2.79 (1H, br s, D_2O exchange, NH), 3.25 (1H, dd, *J* = 6.4, 12.1 Hz), 3.60–3.33 (4H, m), 3.62 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, 2-H), 3.75 (s, 3H, CO_2CH_3). δ_C (100 MHz; DMSO-*d*₆; Me₄S) 33.29 (CH_2), 43.45 (CH), 52.43 (CH_3), 54.14 (CH_2), 55.74 (CH_2), 57.34 (CH), 61.99 (CH), 174.52 (C). CI MS *m/z*: 240 [$(M+1)^+$, 51%], 197 (32), 183 (100), 126 (43), 118 (67), 80 (47), 68 (56), 59 (14), 57 (99). CI HRMS *m/z*: 240.1233 [MH^+], ($C_8H_{14}N_7O_2$) requires 240.1209.

Methyl (±)-(2*R,3*S**,5*R**)-3,5-bis(azidomethyl)-1-[2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]acetyl]pyrrolidine-2-carboxylate (10).** *Method A*: trifluoroacetic acid (0.5 mL) was added to a stirred solution of **1** (200 mg, 0.59 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL). The solution was stirred for 2 h and the volatiles were removed in vacuo. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (8 mL) and DIEA (0.34 mL, 1.94 mmol)

was added followed by Boc-Gly-OH (124 mg, 0.71 mmol) and bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride (150 mg, 0.59 mmol). The solution was stirred for 17 h under argon. The solvent was removed in vacuo and the residue was dissolved in EtOAc (30 mL) and washed sequentially with 2 M aqueous HCl (2 x 20 mL), saturated NaHCO₃ (2 x 20 mL) and dried over Na₂SO₄. Removal of the solvent gave a pale yellow oil (90 mg), which was purified by column chromatography (twice) on silica gel (2:1 hexane/EtOAc in the first column and 20:0.1 CH₂Cl₂/MeOH in the second column) to give dipeptide **10** (15 mg, 6.5%) as a colourless oil. $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2917, 2099, 1742, 1709, 1661, 1502, 1416, 1355, 1248, 1164, 1054, 864. δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S) 1.44 (9H, s, 3 CH₃), 1.61-1.63 (1H, m, D₂O exchange, NH), 1.75 (1H, dt, J = 3.4, 14.0 Hz, 4-HH), 2.30 (1H, dt, J = 9.1, 14.0 Hz, 4-HH), 2.54-2.58 (1H, m), 3.48-3.53 (2H, m), 3.54-3.56 (1H, m), 3.62-3.64 (1H, m), 3.80 (3H, s, CO₂CH₃), 3.93-3.95 (1H, m), 4.26-4.33 (2H, m), 5.30-5.35 (1H, m, 2-H). δ_{C} (100 MHz; CDCl₃; Me₄S) 28.29 (3 CH₃), 29.68 (CH₂), 42.63 (CH), 43.40 (CH₂), 52.29 (CH₂), 53.22 (CH₃), 53.51 (CH₂), 58.06 (CH), 62.91 (CH), 80.03 (C), 155.60 (C), 169.79 (C), 171.37 (C). FAB-MS m/z : 398 [(M + 2)⁺, 7%], 397 [(M + 1)⁺, 39], 341 [(M + 2)⁺ – CO₂Me, 45], 297 (18), 231 (54), 155 (21), 154 (100), 137 (78). FAB HRMS m/z : 397.1962, [MH]⁺, C₁₅H₂₅N₈O₅ requires 397.1948.

Method B: crude **9** (90 mg, 0.38 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (6 mL) and added to a solution of Boc-Gly-OH (79.0 mg, 0.45 mmol), TBTU (193.0 mg, 0.6 mmol) and DIEA (0.26 mL, 1.50 mmol) in dry CH₂Cl₂ (6 mL). The mixture was stirred under argon at room temperature for 63 h. The solvents were evaporated to dryness and the crude product was dissolved in EtOAc (30 mL) and washed sequentially with saturated NaHCO₃ (2 x 20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated. Purification by flash chromatography (3:1 hexane/EtOAc) gave **9** (43 mg) from the first few fractions and **10** (18 mg, 12%) as a colourless oil from a second group of fractions. The physical and spectroscopic data were identical to those of the product obtained using method A.

Dimethyl (2S)-2-[[[(2R*,3S*,5R*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-(tert-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carbonyl]amino]pentanedioate (mixture of diastereomers 12a and 12b). TBTU (0.50 g, 1.57 mmol) was added to a solution of **11** (0.32 g, 0.98 mmol) in dry CH₂Cl₂ (20 mL) and the mixture was stirred under argon at 0 °C for 30 min. A solution of dimethyl L-glutamate hydrochloride (0.25 g, 1.18 mmol) in

CH₂Cl₂ (20 mL) and DIEA (0.68 mL, 3.93 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. After the removal of the solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and successively washed with saturated aqueous NaHCO₃ (2 × 25 mL) and brine (25 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated. The oily residue (540 mg) was purified by column chromatography on silica gel (2:1 hexane/EtOAc) to give **12** as a white solid (0.425 g, 90%), mp = 58–60 °C. $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3318, 2953, 2098, 1738, 1694, 1670, 1531, 1439, 1366, 1205, 1170, 1137, 776. δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) \square 1.39 (6H, s, 2 CH₃), 1.45 (3H s, CH₃), 1.61–1.72 (1H, m), 1.94–2.06 (1H, m), 2.15–2.24 (1H, m), 2.31–2.45 (4H, m), 3.43–3.53 (3H, m), 3.66 (3H, s, CO₂CH₃), 3.73 (3H, s, CO₂CH₃), 3.97–4.13 (3H, m), 4.56 (dd, 1H, J = 7.3, 12.7 Hz, 2-H_{Glu}), 6.48–6.52 and 6.56 (1H, m and d, J = 7.4 Hz, D₂O exchange, NH). δ_{C} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) 26.83, 27.16 and 30.08 (CH₂), 28.12 and 28.25 (3 CH₃), 29.63 and 29.91 (CH₂), 30.78 and 32.0 (CH₂), 40.66 (CH), 42.01 and 42.25 (CH), 51.64 (CH₃), 52.39 (CH₂), 51.93 and 52.51 (CH), 53.41, 53.75 and 53.98 (CH₂), 57.31 and 57.81 (CH), 65.02 and 65.37 (CH), 80.88, 81.08 and 81.39 (C), 154.01 (C), 171.35 (C), 171.88 (C), 173.16 (C). CI MS m/z : 483 [(M + 1)⁺, 1%], 384 (26), 383 (100), 340 (10), 327 (17), 326 (28), 312 (12), 180 (23), 57 (28). Anal. Calcd for C₁₉H₃₀N₈O₇ (482.49): C 47.30, H 6.27, N 23.22; found C 47.62, H 6.41, N, 23.54.

Dimethyl (2S)-2-[[[(2R*,3S*,5R*)-3,5-bis(azidomethyl)pyrrolidine-2-carbonyl]amino]pentanedioate trifluoroacetate (mixture of diastereomers 13a·CF₃CO₂H and 13b·CF₃CO₂H). CF₃CO₂H (13.4 mL, 174 mmol) was added to a cooled (ice bath), stirred suspension of compound **12** (0.79 g, 1.64 mmol) in CH₂Cl₂ (32 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and the solvent was removed under reduced pressure. The brown oily residue was treated with a mixture of EtOAc/Et₂O to give **13·CF₃CO₂H** as a white solid (0.61 g, 75%), mp = 109–111 °C. $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3362, 2956, 2102, 1732, 1668, 1655, 1570, 1439, 1383, 1257, 1198, 1169, 1136, 836, 797, 721. δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) \square 9.47 (br s, 2H, D₂O exchange, NH and CO₂H), 1.79 (dd = 10.2, 23.2 Hz, 1H), 2.03 (dd, 1H, J = 6.9, 7.2, 14.1 Hz), 2.13–2.43 (m, 4H), 2.60–2.70 (1H, m), 3.74 (3H, s, CO₂CH₃), 3.76 (3H, s, CO₂CH₃), 3.64–3.86 (5H, m), 4.44–4.59 (2H, m), 8.05 and 8.47 (1H, 2 d, J = 7.7 Hz, D₂O exchange, NH). δ_{C} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) \square 26.49 and 26.57 (CH₂), 29.89 and 29.99 (CH₂), 32.28 and 32.35 (CH₂), 42.62 and 42.91 (CH),

50.74 (CH₂), 51.87 and 52.06 (CH₃), 52.22 and 52.31 (CH₃), 52.48 (CH₂), 52.70 and 52.83 (CH), 59.46 and 59.57 (CH), 61.74 (CH), 115.99 and 116.10 (C), 162.23 and 162.72 (C), 167.94 and 168.27 (C), 172.22 and 171.35 (C), 172.74 and 173.52 (C). ESI-TOF MS, m/z : 383.2 (M⁺, 100%).

Dimethyl (2S)-2-[[[(2R*,3S,*5R*)-3,5-bis(azidomethyl)-1-[2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]acetyl]pyrrolidine-2-carbonyl]amino]pentanedioate

(mixture of diastereomers 14a and 14b). Et₃N (0.12 mL, 0.87 mmol) was added dropwise to a stirred solution of compound **13** (150 mg, 0.32 mmol) and Boc-Gly-OH (62 mg, 0.35 mmol) in dry CH₂Cl₂ (15 mL); the resulting solution was stirred at room temperature under argon for 10 min. BoPCl (110 mg, 0.43 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 72 h. The resulting solution was washed successively with 10% HCl (10 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness to give a pale yellow oil (120 mg), which was purified by column chromatography (twice) on silica gel (3:1 hexane/EtOAc for the first column and 50:1 CH₂Cl₂/MeOH for the second column) to give **14** (60 mg, 37%) as a pale yellow oil. $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3322, 2955, 2101, 1737, 1713, 1664, 1522, 1436, 1366, 1250, 1206, 1152, 859, 780. δ_{H} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) \square 7.20-7.16, 7.13-7.11 and 6.75-6.73 (3 m, H, D₂O exchange, NH), 1.38, 1.39, 1.47 and 1.48 (9H, 4 s, 3 CH₃), 1.93-2.07 (1H, m), 2.08-2.53 (5H, m), 2.45-2.62 (3H, m), 3.63, 3.65, 3.69 and 3.70 (6H, 4 s, 2 CO₂CH₃), 3.72-3.91 (1H, m), 4.06-4.52 (4H, m), 5.22 and 5.31-5.33 (1H, br s and m, D₂O exchange, NH), 6.73-6.75, 7.11-7.13 and 7.16-7.20, (1H, 3 m, D₂O exchange, NH). δ_{C} (300 MHz; CDCl₃; Me₄S; mixture of diastereomers) \square 26.08 (CH₂), 27.78 (CH), 28.23 and 28.30 (3 CH₃), 29.63, 29.76, and 30.11 (CH₂), 43.37 (CH₂), 43.60 (CH), 46.76 (CH₂), 52.20 and 52.23 (CH₂), 52.04, 2.34 and 52.59 (2 CH₃), 53.88 (CH₂), 58.63 (CH), 64.215 and 64.26 (CH), 79.71 (C), 155.71 (C), 169.67 and 169.76 (C), 170.76 and 170.87 (C), 171.55 and 171.65 (C), 173.65 and 173.71 (C). ESI-TOF MS, m/z : 562.23 [(M + Na)⁺, 100%]. ESI-TOF HRMS, m/z : 524.3976 [M + Na]⁺, (C₂₁H₃₃N₉O₈ + Na) requires 539.2452.

References

1. D. M. Walsh, D. J Selkoe., *Neuron* **2004**, *44*, 181.
2. K. J. Reinikainen, H. Soininen, P. J. Riekkinen, *J. Neurosci. Sci. Res.* **1990**, *27*, 576.

3. R. F. Cowburn, C. J. Fowler, A. Garlind, I. Alafuzoff, L. Nilsson, B. Ninblad, L. Bergstrom, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* **1991**, *54*, 748.
4. C. Galli, O. Meucci, A. Scorziello, T. M. Werge, P. Calissano, G. Schettini, *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 1172.
5. J. L. Mason, P. Ye, K. Suzuki, A.J. D'Ercole, G. K. Matsushima, *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 5703.
6. J. Guan, L. Bennet, S. George, H. J. Waldvogel, R. L. M. Faull, P. D. Gluckman, H. Keunen, A. J. Gunn, *Neuroscience* **2000**, *95*, 831.
7. J. Guan, H. J. Waldvogel, R. L. M. Faull, P. Gluckman, C. Williams, *Neuroscience* **1999**, *89*, 649.
8. B. M. Johnston, E. C. Mallard, C. E. Williams, P. D. Gluckman, *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 300.
9. D. C. Górecki, M. Beresewicz, B. Zablocka, *Neurochem. Int.* **2007**, *51*, 451.
10. V. R. Sara, C. Carlsson-Skwirut, K. Drakenberg, M. B. Giacobini, L. Håkansson, M. Mirmiran, A. Nordberg, L. Olson, M. Reinecke, P. A. Ståhlbom, A. C. Sandberg Nordqvist, *Ann. NY Acad. Sci.* **1993**, *692*, 183.
11. J. Guan, G. B. Thomas, H. Lin, S. Mathai, D. C. Bachelor, S. George, P. D. Gluckman, *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 892.
12. E. Burgos-Ramos, G. A. Martos-Moreno, M. G. López, R. Herranz, D. Aguado-Llera, J. Egea, D. Frechilla, E. Cenarruzabeitia, R. León, E. Arilla-Ferreiro, J. Argente, V. Barrios, *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 360.
13. N. S. Trotter, M. A. Brimble, P. W. R. Harris, D. J. Callis, F. Sieg, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 501.
14. M. Brimble, N. S. Trotter, P. W. R. Harris, F. Sieg, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 519.
15. S. A. Alonso De Diego, P. Muñoz, R. González-Muñiz, R. Herranz, M. Martín-Martínez, E. Cenarruzabeitia, D. Frechilla, J. Del Río, M. L. Jimeno, M. T. García-López, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2279.
16. K.-Y. Hung, P. W. R. Harris, M. A. Brimble, *Synlett* **2009**, 1233.
17. P. W. R. Harris, M. A. Brimble, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2696.

18. M. Y. H. Lai, M. A. Brimble, D. J. Callis, P. W. R. Harris, M. S. Levi, F. Sieg, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 533.
19. S. A. Alonso De Diego, M. Gutierrez-Rodríguez, M. J. Pérez de la Vega, D. Casabona, C. Cativiela, R. González-Muñiz, R. Herranz, E. Cenarruzabeitia, D. Frechilla, J. Del Río, M. L. Jimeno, M. T. García-López, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1392.
20. P. W. R. Harris, M. A. Brimble, V. J. Muir, M. Y. H. Lai, N. S. Trotter, D. J. Callis, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10018.
21. J. Ferreira da Costa, O. Caamaño, F. Fernández, X. García-Mera, P. Midón, J. E. Rodríguez-Borges, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6797.
22. J. García, F. Urpí, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 484.
23. T. Mita, N. Fukuda, F. X. Roca, M. Kanai, M. Shibasaki, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 259.
24. H. Chapius, P. Strazewski, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 12108.
25. S. Nozaki, *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 162.
26. W. Köning, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
27. R. D. Tung, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4342.
28. L. A. Carpino, H. Imazumi, H. El-Faham, F. J. Ferrer. C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuch, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441.
29. H. M. M. Bastiaans, J. L. H. C. J. Van der BaanOtteneijm, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3880.
30. Ferreira da Costa, J.; Alonso, N.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X., presented in part at the 9th Spanish-Italian Symposium on Organic Chemistry, Tenerife, Canary Islands, Spain, February 2012.